

Charakterisierung der Oberflächenglykosylierung von equinen
Neutrophilen und Analyse von Veränderungen bei der equinen
rezidivierenden Uveitis

von Carolin Johanna Sprengel

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Charakterisierung der Oberflächenglykosylierung von equinen
Neutrophilen und Analyse von Veränderungen bei der equinen
rezidivierenden Uveitis

von Carolin Johanna Sprengel

aus Schongau

München 2026

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

Korreferent/in: Univ.-Prof. Dr. Bernd Lepenies

Tag der Promotion: 07. Februar 2026

Für Antonie und Amelie

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATUR	3
2.1	Neutrophile Granulozyten	3
2.1.1	Granulozyten im Überblick.....	3
2.1.2	Entstehung im Knochenmark und Freisetzung in die Peripherie	5
2.1.3	Lebensdauer und Rekrutierung von Neutrophilen	7
2.1.4	Abwehrmechanismen der Neutrophilen	10
2.1.4.1	Oxidativer Burst.....	10
2.1.4.2	Neutrophile Extrazelluläre Netze (NETs).....	11
2.1.4.3	Freisetzung von Granula	12
2.1.4.4	Phagozytose.....	14
2.1.5	Heterogenität und Immunmodulation von Neutrophilen	15
2.2	Glykosylierungen	17
2.2.1	Definition und Entstehung von Glykosylierungen.....	17
2.2.2	Funktionen von Glykosylierungen.....	19
2.2.3	Einsatz von Pflanzenlektinen zum Nachweis von Glykosylierungen.....	21
2.2.4	Bedeutung von aberranten Glykosylierungen bei autoimmunen Krankheitsbildern	23
2.3	Equine rezidivierende Uveitis (ERU)	24
2.3.1	Definition und Klinik der ERU.....	24
2.3.2	Ätiologie, Pathogenese und Therapie der ERU	26
2.3.3	Die ERU als spontanes Tiermodell für die autoimmune Uveitis des Menschen	29
2.3.4	Die Rolle des neutrophilen Granulozyten in der ERU	31
3	MATERIAL UND METHODEN	33
3.1	Probenmaterial	33
3.2	Isolierung von Neutrophilen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation	35
3.2.1	Puffer und Lösungen	35
3.2.2	Gewinnung von Blutproben.....	36
3.2.3	Isolierung von Neutrophilen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation.....	36
3.2.4	Ermittlung der Zellzahl	37

3.3 Durchflusszytometrie zur Ermittlung der Oberflächen-glykosylierung mittels Pflanzenlektinen.....	37
3.3.1 Puffer und Lösungen	37
3.3.2 Lebend-Tot-Färbung.....	38
3.3.3 Pflanzenlektine und fluoreszierende Liganden	38
3.3.4 Färbung	41
3.3.5 Detektion mittels Durchflusszytometer.....	41
3.3.6 Auswertung und Statistik	42
3.4 Immunzytochemie.....	43
3.4.1 Puffer und Lösungen	43
3.4.2 Pflanzenlektine, Antikörper und fluoreszierende Liganden	43
3.4.3 Färbung	44
3.4.4 Transfer der Proben auf den Objektträger, Visualisierung und Quantifizierung.....	45
3.4.5 Statistische Analyse.....	45
3.5 Jacalin-Präzipitation	46
3.5.1 Puffer und Lösungen	46
3.5.2 Zellyse	47
3.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate.....	48
3.5.4 Pflanzenlektinpräzipitation mit JAC-Agarose	48
3.5.5 SDS-Page.....	49
3.5.5.1 Puffer und Lösungen	49
3.5.5.2 Durchführung der 1D Gelelektrophorese.....	52
3.5.6 Sensitive Coomassiefärbung nach Kang zur Visualisierung der Proteinbanden	53
3.5.6.1 Puffer und Lösungen	53
3.5.6.2 Durchführung der Coomassie-Färbung nach Kang.....	54
3.5.6.3 Berechnung des molekularen Gewichts einer unbekanntem Bande ...	54
3.5.6.4 Quantifizierung und statistische Auswertung der Proteinbanden	55
3.6 Inhibition der JAC-Bindung an Neutrophile	55
3.6.1 Puffer und Lösungen	55
3.6.2 Pflanzenlektine und verwendete Zucker	56

3.6.3	Zuckerinhibierung des JAC und anschließende Färbung	57
3.6.4	Detektion mittels Durchflusszytometrie	57
3.6.5	Auswertung und Statistik	58
3.7	Evaluation von proteomischen Daten von Neutrophilen Granulozyten...59	
3.7.1	Verwendung des Datensatzes PXD013648.....	59
3.7.2	Berechnung von möglichen O-Glykosylierungen via NetOGlyc 4.0	59
4	ERGEBNISSE	60
4.1	Charakterisierung der Oberflächenglykosylierung von equinen	
Neutrophilen		60
4.1.1	O-Glykan-bindende Pflanzenlektine	61
4.1.2	N-Glykan-bindende Pflanzenlektine.....	63
4.1.3	Mannose-bindende Pflanzenlektine	65
4.1.4	Fukose-bindende Pflanzenlektine	67
4.1.5	Terminale Galaktose- und N-Acetyllaktosamin-bindende Pflanzenlektine	69
4.1.6	Terminalen N-Acetylgalaktosamin-bindende Pflanzenlektine	71
4.1.7	N-Acetylglukosamin- und Sulfat-bindende Pflanzenlektine.....	73
4.2	Inhibierung der JAC-Bindung durch verschiedene Saccharide	77
4.3	Immunzytologischer Nachweis der verringerten BanLec-bindenden und erhöhten JAC-bindenden Oberflächenglykane auf ERU-Neutrophilen	78
4.4	Präzipitation von O-Glykanen mit Jacalin.....	80
4.4.1	Detektion JAC-assoziiertes O-glykosylierter Kandidatenproteine.....	80
4.4.2	Berechnung des exakten molekularen Gewichts der unbekannt Proteine	82
4.5	Identifikation möglicher Kandidatenproteine für O-Glykosylierung anhand des Proteoms der Neutrophilen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden	83
4.5.1	Auswertung eines Datensatzes des neutrophilen Proteoms nach festgelegten Kriterien	84
4.5.2	CDCP1 und ITGB2 sind mögliche Kandidatenproteine mit erhöhter Abundanz und verstärkter O-Glykosylierung in ERU	84

INHALTSVERZEICHNIS

4.5.3 Immunzytologischer Nachweis des ITGB2 (CD18) und Kolokalisation von JAC.....	86
5 DISKUSSION	87
6 ZUSAMMENFASSUNG	109
7 SUMMARY	111
8 LITERATURVERZEICHNIS	113
9 DANKSAGUNG	128

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
² H ₂ O	Deuteriumoxid
µg	Mikrogramm
AU	Autoimmune Uveitis
CAM	Adhäsionsmolekül (<i>engl.</i> adhesion molecule)
CD	Oberflächenmoleküle auf Immunzellen zur Einteilung dieser, <i>engl.</i> Cluster of Differentiation
CD4+-Zellen	CD4 positive Zellen
CDCP1	CUB Domäne-enhaltendes Protein 1 (<i>engl.</i> CUB Domain Containing Protein 1, CDCP1)
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
cRALBP	Zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein
CXCL	CXC-Chemokinligand
CXCR	CXC-Rezeptor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EAU	experimentelle autoimmune Uveitis
<i>engl.</i>	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERU	Equine rezidivierende Uveitis
et al.	und andere (<i>lat.</i> et alii)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreuung, (<i>engl.</i> Forward-Scatter)
g	Gramm
GAL	Galektin
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GALNT	Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferase
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (<i>engl.</i> granulocyte colony-stimulating factor)
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
gtIgG	Immunglobulin G der Ziege
HOCL	Hypochlorsäure
I.E.	internationale Einheiten
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül (<i>engl.</i> Intracellular Adhesion Molecule)
Ig	Immunglobulin

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IRBP	Interphotorezeptor Retinoid-bindendes Protein
ITGB2	Integrin Beta 2
kg	Kilogramm
KS	Kolmogorov-Smirnov-Test
LacdiNAc	N-Acetylgalaktosamin- β 1-4-N-Acetylglucosamin
LacNAc	N-Acetyllaktosamin
LDN	<i>engl.</i> Low-density neutrophil
LFA	Lymphozytenfunktion-assoziiertes Antigen
MAC	Makrophagenantigen
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität, <i>engl.</i> mean fluorescence intensity
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>engl.</i> major histocompatibility complex)
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Milimolar
mm	Milimeter
MPO	Myeloperoxidase
Mrc	<i>engl.</i> Medical Research Council Cell Strain
NADP+	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotide-Phosphat, oxidierte Form
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotide-Phosphat
NCP	Neutrophilen-spezifische Vorläuferzelle (<i>engl.</i> neutrophil-committed progenitor cell)
NE	neutrophile Elastase
NETs	Neutrophile extrazelluläre Netze (<i>engl.</i> neutrophil extracellular nets)
nm	Nanometer
NOX	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotide-Phosphat-Oxidase-Komplex
ns	nicht signifikant
PAD	Protein-Arginin-Deiminase
PAMP	pathogenassoziiertes molekulares Muster (<i>engl.</i> pathogen-associated molecular pattern)
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen (<i>engl.</i> peripheral blood mononuclear cells)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PSGL-1	P-Selektin Glykoproteinligand 1
PTM	Post-translationale Modifikation (<i>engl.</i> post-translational modification)
RA	rheumatoide Arthritis
RAB	RAS-verwandtes Protein im Gehirn, (<i>engl.</i> ras-related proteins in brain)
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung (<i>engl.</i> relative centrifugal force)
RF	rheumatoider Faktor
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl.</i> ribonuclein acid)
ROS	reaktive Sauerstoffverbindungen (<i>engl.</i> reactive oxigen species)
RPE	retinalen Pigmentepithelzellen
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (<i>engl.</i> standard deviation)
SDF	<i>engl.</i> stromal cell-derived factor
Siglecs	Sialinsäure-bindende Immunglobulin-ähnliche Lektine
SLE	Systemischer Lupus Erythematosus
SNARE	<i>engl.</i> soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
SOCS1	<i>engl.</i> suppressors of cytokine signaling 1
SOCS-KIR	<i>engl.</i> suppressors of cytokine signaling kinase inhibitory region
SOD	Superoxiddismutase
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
Th	T-Helferzellen
Tn	Thomsen nouvelle
UGGT 1	UDP-Glucose-Glycoprotein-Glucosyltransferase 1
UPD	Uridin-Diphosphat
z.B.	Zum Beispiel

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Pflanzenlektine:

AAL	Aleuria Aurantia Lektin
ABL	Agaricus Bisporus Lektin
ACL	Amaranthus Caudatus Lektin
BanLec	Bananen Lektin
BPL	Bauhinia Purpurea Lektin
ConA	Concanavalin A
DBA	Dolichos Biflorus Agglutinin
DSL	Datura Stramonium Lektin
ECL	Erythrina Cristagalli Lektin
GNL	Galanthus Nivalis Lektin
GSL-I	Griffonia Simplicifolia Lektin I
GSL-I-B4	Griffonia Simplicifolia Lektin I Isolektin B4
GSL-II	Griffonia Simplicifolia Lektin II
HHL	Hippeastrum Hybrid Lektin
JAC	Jacalin
LCA	Lens Culinaris Agglutinin
LEL	Lycopersicon Esculentum Lektin
LTL	Lotus Tetragonolobus Lektin
MAL-II	Maackia Amurensis Lektin II
NPL	Narcissus Pseudonarcissus Lektin
PHA-E	Phaseolus Vulgaris Erythroagglutinin
PHA-L	Phaseolus Vulgaris Leukoagglutinin
PNA	Peanut Agglutinin
PSA	Pisum Sativum Agglutinin
PTL	Psophocarpus Tetragonolobus Lektin
RCA-I	Ricinus Communis Agglutinin I
SBA	Soybean Agglutinin
SJA	Sophora Japonica Agglutinin
SNA	Sambuccus Nigra Agglutinin
STL	Solanum Tuberosum Lektin
SWGA	succinyliertes Wheat Germ Agglutinin
UEA-I	Ulex Europaeus Agglutinin I

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

VVA	Vicia Villosa Lektin
WFA	Wisteria Floribunda Lektin
WGA	Wheat Germ Agglutinin

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 4.1 Bindungsverhalten von O-Glykan-bindenden Pflanzenlektinen auf der Zelloberfläche der Neutrophilen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden.....	62
Abbildung 4.2 Bindungsverhalten von N-Glykan-bindenden Pflanzenlektinen auf der Zelloberfläche der Neutrophilen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden.....	64
Abbildung 4.3 Bindungsverhalten von Mannose-bindenden Pflanzenlektinen auf der Zelloberfläche der Neutrophilen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden.....	66
Abbildung 4.4 Bindungsverhalten von Fukose-bindenden Pflanzenlektinen auf der Zelloberfläche der Neutrophilen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden.....	68
Abbildung 4.5 Bindungsverhaltens von Galaktose und N-Acetyllaktosamin-bindenden Pflanzenlektinen auf der Zelloberfläche der Neutrophilen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden.....	71
Abbildung 4.6 Bindungsverhaltens von N-Acetylgalaktosamin-bindenden Pflanzenlektinen auf der Zelloberfläche der Neutrophilen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden.....	72
Abbildung 4.7 Bindungsverhaltens von N-Acetylglukosamin- und Sulfat-bindenden Pflanzenlektinen auf der Zelloberfläche der Neutrophilen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden.....	74
Abbildung 4.8 JAC-Inhibierung mit den Sacchariden Galaktose, Sukrose und Mannose.....	77
Abbildung 4.9 ERU-assoziierte Veränderungen der Glykosylierung der Neutrophilenoberfläche von gesunden und an ERU erkrankten Pferden.....	79
Abbildung 4.10 Proteine, die mittels JAC-Präzipitation angereichert wurden.	81
Abbildung 4.11 Graph zur Berechnung des molekularen Gewichts von unbekanntem Banden.....	83
Abbildung 4.12 JAC- und ITGB2-Bindung auf der Oberfläche von Neutrophilen aus gesunden und an ERU erkrankten Pferden.....	86

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 4.1 Bindungsspezifitäten und Abundanz auf der Zelloberfläche von allen in dieser Studie verwendeten Pflanzenlektinen, sortiert nach der Signifikanz von Kontrolle zu ERU.....	76
Tabelle 4.2 Ausgewählte Proteine nach der Festlegung ausgewählter Kriterien.....	85

1 EINLEITUNG

Neutrophile Granulozyten gelten als Ersthelfer bei einer beginnenden Entzündung im Körper (LEBLANC et al., 2024). Ähnlich einem Rettungssanitäter, der nach einem Unfall alle notwendigen Maßnahmen einleitet, agieren auch Neutrophile als zentrale Initiatoren der frühen Immunantwort (BURN et al., 2021). Sie werden über Chemokine rekrutiert und gelangen so zielgerichtet an den Ort der Entzündung, wo sie durch ihre Effektormechanismen unmittelbar zur Eindämmung der Schädigung beitragen (LEBLANC et al., 2024). Gleichzeitig sezernieren sie Signalmoleküle, die die Rekrutierung und Aktivierung von Zellen des adaptiven Immunsystems ermöglichen (BURN et al., 2021). Damit übernehmen Neutrophile nicht nur eine unmittelbare Abwehrfunktion am Unfallort, sondern auch eine Schlüsselrolle in der Regulierung der nachfolgenden Immunantwort, die den Ausgang der Entzündung bestimmen (WANG et al., 2024b). Bei einer autoimmunen Erkrankung ist diese normalerweise physiologische Antwort des Immunsystems auf Noxen massiv fehlreguliert (WANG et al., 2024b). Körper eigene Autoantigene dienen hierbei als Gefahrensignale, die Immunzellen anlocken und lösen dadurch eine übersteigerte Entzündungsreaktion aus, die zu starken Schädigungen des Gewebes führen kann (DEEG et al., 2002a; HOWARD et al., 2005; BRAVO-ZEHNDER et al., 2015). In der Vergangenheit lag der Fokus der Erforschung von autoimmunen Erkrankungen auf den Mechanismen des adaptiven Immunsystems, da dieses als aktiver Effektor der Autoimmunität gilt (PISETSKY, 2023; WANG et al., 2024b). Inzwischen richtet sich das wissenschaftliche Interesse jedoch wieder stärker auf die angeborene Immunantwort, insbesondere auf Neutrophile, die als Ersthelfer den Verlauf der Entzündung maßgeblich beeinflussen (HERRERO-CERVERA et al., 2022; LEBLANC et al., 2024) und beispielsweise bei Pferden, die an equiner rezidivierender Uveitis (ERU) erkrankt sind, eine weitaus komplexere Rolle einnehmen als bisher erwartet (DEGROOTE et al., 2023). Neutrophile exprimieren auf ihrer Oberfläche zahlreiche Proteine, die Interaktionen mit anderen Zellen ermöglichen und regulatorische Prozesse in Gang setzen können (ZHANG et al., 2024). Viele dieser Oberflächenproteine haben eine spezifische Glykosylierung (HE et al., 2024). Dies beeinflusst ihre Stabilität, macht sie erkennbar und beeinflusst zudem ihre Funktion. Eine gestörte Glykosylierung kann daher als Indikator für fehlregulierte Prozesse dienen (HE et al., 2024). Die detaillierte

Charakterisierung der Oberflächenglykosylierung Neutrophiler von gesunden Pferden ist dabei der erste Schritt, um den physiologischen Zustand der Zelle zu verstehen. Ausgehend davon stellt der Vergleich mit einer Erkrankung einen spannenden Ansatz dar, um neue Einblicke in die Pathogenese autoimmuner Krankheiten zu erhalten. Eine besonders relevante autoimmune Erkrankung ist die equine rezidivierende Uveitis. Diese Erkrankung des Pferdes ist tiermedizinisch hochrelevant und besitzt einen hohen translationalen Wert, da sie in vielerlei Hinsicht mit der autoimmunen Uveitis (AU) des Menschen vergleichbar ist. Ihr schubförmiger rezidivierender Charakter von stetig wiederkehrenden Uveitisepisoden konnte bisher nur unzureichend von anderen Tiermodellen reproduziert werden, und somit stellt die ERU das einzige spontane Modell für diese autoimmune Erkrankung dar (DEEG et al., 2008; YANG et al., 2022). Bisher lag der Forschungsschwerpunkt überwiegend auf der Rolle von Autoantigenen sowie der T-zellvermittelten Immunantwort (DEEG et al., 2001; DEEG et al., 2006; BARFUSSER et al., 2021; SOTH et al., 2024). Es gibt jedoch immer wieder Bestrebungen, die Neutrophilen in der ERU näher zu erforschen, da sie neben den T-Zellen im ERU-erkrankten Auge nachgewiesen werden konnten (DEEG et al., 2001). Daher war es das Ziel dieser Arbeit, die Oberflächenglykosylierung von Neutrophilen gesunder Pferde näher zu charakterisieren, um eine Grundlage für weiterführende Untersuchungen im physiologischen und pathologischen Zustand zu schaffen. Darüber hinaus sollte die Oberflächenglykosylierungen von Neutrophilen aus an ERU erkrankten Pferden charakterisiert werden und mit der Glykosylierung von gesunden Pferden verglichen werden, da die ERU eine tiermedizinisch hochrelevante Erkrankung ist und Neutrophile eine wichtige Rolle bei der ERU einnehmen. Dabei wurde das Ziel verfolgt, neue Erkenntnisse über die Rolle von Neutrophilen in der ERU zu generieren.

2 LITERATUR

2.1 Neutrophile Granulozyten

2.1.1 Granulozyten im Überblick

Pferde besitzen wie Menschen ein granulozytäres Blutbild (FINGERHUT et al., 2022; AWASTHI und SARODE, 2024). Per Definition bedeutet das, dass in diesen Spezies Granulozyten prozentual die am häufigsten vertretenen Leukozyten sind. Granulozyten gehören damit zahlenmäßig bei beiden Spezies auch zu den häufigsten Zellen der angeborenen Immunantwort, neben Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, Mastzellen und „Innate Lymphoid Cells“, zu denen auch die natürlichen Killerzellen gezählt werden (MAWHINNEY et al., 2022; JOSEPH et al., 2025). Das angeborene Immunsystem führt dabei klassischerweise schnelle, aber unspezifische Reaktionen auf Erreger aus (WANG et al., 2024b). Daher sind Granulozyten die ersten Zellen, die bei einer Infektion zur Stelle sind und dort unspezifisch und damit universal Pathogene erkennen können (RUNGELRATH et al., 2020; HERRERO-CERVERA et al., 2022; WANG et al., 2024b). Klassischerweise werden Granulozyten in drei Subklassen aufgeteilt: basophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und neutrophile Granulozyten (GEERING et al., 2013). Bereits im 19. Jahrhundert gelang es Paul Ehrlich, diese drei Subklassen in Blutaussstrichen zu identifizieren (EHRLICH, 1879). Daher ist auch die Art, wie sich diese Zellen anfärben lassen namensgebend gewesen. Der Name eosinophile Granulozyten geht darauf zurück, dass sich die Granula dieser Zellen besonders gut mit Eosin, einem sauren Farbstoff anfärben lässt (EHRLICH, 1879). Sie können daher frei übersetzt als eosin-liebende Granulozyten bezeichnet werden (EHRLICH, 1879). Verantwortlich dafür sind die kationischen Granulaproteine der Eosinophilen, wie die eosinophile Peroxidase oder das eosinophile kationische Protein, die sich neben ihren Färbereigenschaften auch funktionell von den Granula anderer Granulozyten unterscheidet (ACHARYA und ACKERMAN, 2014). Ähnlich verhält es sich mit den basophilen Granulozyten, deren Granula sich durch basische Farbstoffe anfärben lässt (KAY, 2016). Neutrophile Granulozyten dagegen lassen sich weder von sauren noch basischen Farbstoffen anfärben (KAY, 2016). Aufgrund dieser optischen

beziehungsweise granulären Eigenschaften der Subklassen von Granulozyten, unterschieden sie sich auch in ihrer Funktion (ZHANG et al., 2024; OGULUR et al., 2025). Die eosinophilen Granulozyten werden mit Parasitenbefall und Allergien in Verbindung gebracht (OGULUR et al., 2025; SU et al., 2025). Durch die Exposition von Allergenen, kann beim Menschen das eosinophile Asthma entstehen, dass durch eine erhöhte Anzahl von Eosinophilen im Blut und Sputum erkannt wird (HUSSAIN und LIU, 2024). Bei Pferden mit equinem Asthma kann eine ähnliche Einteilung vorgenommen werden, wenn in der zytologischen Auswertung einer bronchoalveolären Lavage erhöhte Zellzahlen von Eosinophilen festgestellt werden können (KARAGIANNI et al., 2024). Eosinophile können sich an einem breiten Repertoire an Abwehrmechanismen bedienen. Analog zu den Neutrophilen (siehe Kapitel 2.1.4.2) können sie Chromatinfäden zur Erregerabwehr entlassen, die als eosinophile extrazelluläre Netze bezeichnet werden (UEKI et al., 2016). Daneben ist auch die Degranulation ihrer spezifischen eosinophilen Granula ein wichtiger Abwehrmechanismus (GIGON et al., 2023). Basophile werden ebenfalls mit allergischen Reaktion und der Abwehr von Helminthen assoziiert (KASTL und POHLMAN, 2022). Bereits in den 7er Jahren konnte gezeigt werden, dass eine basophile Leukämiezelllinie aus der Ratte IgE binden kann (KULCZYCKI et al., 1974). IgE und auch Liganden von Toll-like Rezeptoren induzieren die Produktion von Zytokinen und aktivieren die Degranulation von basophilen Granula, die neben Histamin, Proteoglykanen, biogenen Aminen auch das „Major Basic Protein“ enthalten (SUURMOND et al., 2014; KASTL und POHLMAN, 2022). Beispielsweise ist eine Insektenstich-Hypersensitivität, eine Form der allergischen Dermatitis bei Pferden, durch die Infiltration von Eosinophilen und eine erhöhte Anzahl an Basophilen im Blut und in Hautläsionen gekennzeichnet und werden daher eng mit der Pathogenese assoziiert (RAZA et al., 2021; MARSELLA et al., 2023; JEBBAWI et al., 2024). Des Weiteren wurde festgestellt, dass Eosinophile bei Urtikaria, einem Symptom, das auch bei der Insektenstich-Hypersensitivität auftritt, generell eine wichtige Rolle einnehmen (BIRKMANN et al., 2024). Beide Subklassen kommen im Blut von gesunden Pferden nur in sehr geringer Zahl vor. Den größten Teil der Granulozyten bilden die neutrophilen Granulozyten (ZHANG et al., 2024). Daher wird im Weiteren näher auf diese Subklasse eingegangen.

2.1.2 Entstehung im Knochenmark und Freisetzung in die Peripherie

Der Ausgangspunkt für die Entstehung aller Blutzellen ist die hämatopoetische Stammzelle, die erstmals 1988 aus der Maus isoliert werden konnte (SPANGRUDE et al., 1988). Seitdem konnte nach und nach mehr über die Neutrophilen-spezifische Granulopoese herausgefunden werden und dennoch werden bis heute immer wieder neue Erkenntnisse über die Entstehung der Neutrophilen erlangt. Die weitere Untersuchung wird durch die Erkenntnis gestützt, dass die Neutrophilen eine heterogene Zellklasse sind (CALZETTI et al., 2023). Deshalb wird angenommen, dass sie sich bereits in der Entwicklung unterscheiden (CALZETTI et al., 2023). Vor kurzem gelang es einer italienischen Forschergruppe, zwei neue neutrophile Vorläuferzellen aus dem menschlichen Knochenmark zu isolieren (SIGNORETTO et al., 2025). Dies baut auf der Entdeckung der Neutrophil-spezifischen Vorläuferzellen (*engl.* neutrophil-committed progenitor cells, NCP) von derselben Arbeitsgruppe auf (CALZETTI et al., 2022), die im darauffolgenden Jahr ihre Erkenntnisse folgendermaßen in das bis dahin geltende System der Granulopoese einordnete: Die NCPs befinden sich in ihrer Entwicklungsstufe direkt nach den hämatopoetischen Stammzellen (CALZETTI et al., 2023). Insgesamt wurden bisher sechs Entwicklungsstufen der NCPs entdeckt (SIGNORETTO et al., 2025). Aus diesen Zellen entstehen die Promyelozyten, die sich weiter zu den Myelozyten differenzieren (CALZETTI et al., 2023). Über die Stufe der Metamyelozyten werden schließlich die stabkernigen neutrophilen Granulozyten gebildet, die durch ihre fehlende Segmentierung des Zellkerns von den reifen Neutrophilen unterschieden werden können ((zusammengefasst in, (CALZETTI et al., 2023)) (SIGNORETTO et al., 2025)).

Nach der Reifung der Neutrophilen verbleiben diese vorerst im Knochenmark (DEVI et al., 2013). Im murinen Modell wurde gezeigt, dass der CXC Rezeptor 4 (CXCR4) und der von Stromazellen abgeleitete Faktor 1 (*engl.* stromal cell-derived factor 1, SDF-1) verantwortlich für diesen Verbleib im Knochenmark ist, welche eine Migration aus dem Knochenmark verhindern (MARTIN et al., 2003). Das SDF-1 oder auch CXC-Chemoligand (CXCL) 12 genannt, wird von Stromazellen im Knochenmark gebildet, was im murinen Modell nachgewiesen werden konnte (ZHOU et al., 2012). Des Weiteren verhindert SDF-1 Interaktionen mit dem CXC-Rezeptor 2, allerdings nur zu 60% (MARTIN et al., 2003). Daher exprimieren nur reife Neutrophile den CXC-Rezeptor 2 (EVRARD et al., 2018), der für die Freisetzung ins Blut eine entscheidende

Rolle spielt (DEVI et al., 2013). Ebenso hat der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF) eine wichtige Funktion in der Zelldifferenzierung, wie auch bei der Migration der Neutrophilen aus dem Blut (WENGNER et al., 2008; DEVI et al., 2013). Es konnte nachgewiesen werden, dass murine und humane myeloide Zellen nach Inkubation mit G-CSF weniger CXCR4 exprimieren und zudem auch signifikant schlechter auf SDF-1 reagieren (KIM et al., 2006). In einem anderen G-CSF-defizienten experimentellen autoimmunen Uveitis (EAU) Modell der Maus oder mit G-CSF-Antikörper behandelten Mäusen konnte belegt werden, dass bei Neutrophilen im Knochenmark die CXCR4 Expression steigt, während die CXCR2 Expression sinkt (GOLDBERG et al., 2016). Somit konnte hier der wichtige Einfluss von G-CSF auf die CXCR2 und CXCR4 gezeigt werden (GOLDBERG et al., 2016). Durch G-CSF werden die Chemokine CXCL1 und CXCL2 freigesetzt, die wiederum an den CXCR2 binden (KOHLENER et al., 2011). Dies führt zu einer schnellen Freisetzung der Neutrophilen in die Blutbahn, beispielsweise im Fall einer akuten Entzündungsreaktion (WENGNER et al., 2008; DE FILIPPO et al., 2013).

Nach einigen Stunden der Zirkulation im Blut, wird CXCR4 bei den Neutrophilen erneut hochreguliert (MARTIN et al., 2003). Diese wiederkehrende Expression von CXCR4 und eine damit verbundene verminderte Expression von CXCR2, gilt als Seneszenzmarkierung der Zellen (STRYDOM und RANKIN, 2013). Diese Markierung tritt nach ungefähr sechs Stunden im Blut auf (NG et al., 2019), bevorzugt werden diese seneszenten Zellen von SDF-1 angelockt und folgen diesem Reiz zurück ins Knochenmark, was experimentell in der Maus bewiesen wurde (MARTIN et al., 2003). Neben dem Knochenmark konnte gezeigt werden, dass sich murine seneszente Neutrophile, die CXCR4 vermehrt exprimieren, sich zu gleichen Teilen auch in der Leber und der Milz verteilen, wo Makrophagen über das Epithel im direkten Kontakt mit den Neutrophilen im Blutstrom stehen und sie dort erkennen und phagozytieren können (FURZE und RANKIN, 2008). Im Knochenmark gehen die Neutrophilen schließlich in Apoptose über und werden anschließend von lokalen stromalen Makrophagen phagozytiert (FURZE und RANKIN, 2008). Makrophagen werden durch die apoptotischen Neutrophilen dazu stimuliert, G-CSF zu produzieren und damit wird die Produktion neuer Neutrophilen angeregt, um die Homöostase in der Granulopoese aufrecht zu erhalten (FURZE und RANKIN, 2008). Dem entgegen wurde in einer anderen Studie mit murinen Modell festgestellt, dass die neutrophile Homöostase vor

allem über die IL-23-IL-17-G-CSF-Achse reguliert wird (STARK et al., 2005). Dabei konnte gezeigt werden, dass Makrophagen oder dendritische Zellen durch die Phagozytose von apoptotischen Neutrophilen, die IL-23 Sekretion hemmen und dadurch auch die Produktion von IL-17 und G-CSF hemmen (STARK et al., 2005). Es wird deutlich, dass auch die Elimination der Neutrophilen eine wichtige Rolle für die Homöostase der Granulopoese spielt (STARK et al., 2005).

2.1.3 Lebensdauer und Rekrutierung von Neutrophilen

Als Zellen des angeborenen Immunsystems patrouillieren Neutrophile im Blut, bis sie zu einer Entzündungsreaktion rekrutiert oder wieder abgebaut werden (TAK et al., 2013). Dabei ist es immer noch ein umstrittenes Thema, wie lange Neutrophile im Blut überleben (WIGERBLAD und KAPLAN, 2023).

Teilweise wird immer noch die Meinung vertreten, dass Neutrophile nur eine sehr kurze Lebensspanne von wenigen Stunden haben (KOLACZKOWSKA und KUBES, 2013; HE et al., 2025). In einer Untersuchung wurden humane Neutrophile mit $^2\text{H}_2\text{O}$ markiert und konnten in dieser Studie bis zu 5.4 Tage im Schnitt *in vivo* überleben (PILLAY et al., 2010). Allerdings wird diskutiert, ob die angegebenen 5.4 Tage eventuell auch die Verweildauer im Knochenmark miteingeschlossen hat und damit die Zeit in der Zirkulation, doch wie vorher angenommen sehr kurz ist (TAK et al., 2013). Dies wäre im Einklang mit der Erkenntnis, dass die Lebensspanne von Neutrophilen durch Ereignisse wie eine Entzündungsreaktion beeinflusst werden können (zusammengefasst in (TAK et al., 2013)). Ereignisse, wie eine Infizierung mit Dengue Virus, führen zu einer Aktivierung der Neutrophilen, was ihre Lebenszeit gegenüber nichtinfizierten Neutrophilen verlängert (KAMSOM et al., 2024). Eine andere Untersuchung ergab, dass Neutrophile, die aus Patienten nach einer traumatischen Verletzung isoliert wurden, erst zu einem späteren Zeitpunkt in die spontane Apoptose gehen als Neutrophile aus gesunden Probanden (NICHOLSON et al., 2025). Hier wurde die stärkere Expression des Myeloidzell-Leukämie 1 Protein verantwortlich dafür gemacht (NICHOLSON et al., 2025). Das Myeloidzell-Leukämie 1 Protein wirkt antiapoptotisch, dadurch dass es das mitochondriale Membranpotential aufrechterhält und sorgt damit für eine längere Lebensspanne von Neutrophilen (NICHOLSON et al., 2025).

Die neutrophile Rekrutierung wird im Allgemeinen in Etappen unterteilt und im Folgenden erklärt (KOLACZKOWSKA und KUBES, 2013): Durch das Ausbrechen einer Entzündung werden am Ort des Geschehens Entzündungsmediatoren freigesetzt, die das Endothel aktivieren und verändern (KOLACZKOWSKA und KUBES, 2013). Über Muster-Erkennungs-Rezeptoren kann das Endothel auch selbst Pathogene erkennen und so aktiviert werden (KOLACZKOWSKA und KUBES, 2013). Als Folge der Aktivierung werden von Endothel E- und P-Selektine exprimiert (LEY et al., 2007; PETRI et al., 2008; PHILLIPSON und KUBES, 2011), an die wiederum Neutrophile binden können. Die Neutrophilen selbst exprimieren das L-Selektin (BARGATZE et al., 1994; PETRI et al., 2008), den P-Selektin Glykoproteinligand 1 (PSGL-1), den E-Selektinligand-1 und CD44 inklusive Glykosylierung auf ihrer Oberfläche, dass die Anheftung an das Endothel und das Rollen über das Endothel ermöglicht (PHILLIPSON und KUBES, 2011; KOLACZKOWSKA und KUBES, 2013). Wichtig ist hierbei auch der Scherstress, der auf die Neutrophilen durch die Strömung im Blut wirkt (LEY et al., 2007). Dieser bewirkt, dass die Adhäsion an das Endothel gestärkt wird, aber auch dass die Rollbewegungen stattfinden (LEY et al., 2007). Die Neutrophilen werden durch das Rollen aktiviert, indem sie in Kontakt mit den Chemokinen auf der Endotheloberfläche treten (KOLACZKOWSKA und KUBES, 2013). Durch negativ geladene Heparansulfate werden diese Chemokine an das Endothel gebunden, da sie sonst mit dem Blutstrom wegtreiben würden (MASSENA et al., 2010). So kann sich ein chemotaktischer Gradient aufbauen (KOLACZKOWSKA und KUBES, 2013). Die rollenden Neutrophilen binden diese Chemokine an ihrem G Protein-gekoppelten Rezeptor und lösen damit eine Konformationsänderung im β_2 -Integrin aus (PHILLIPSON und KUBES, 2011). Diese wiederum sorgt für die Transmigration der Neutrophilen in das Gewebe (PHILLIPSON und KUBES, 2011). Wichtige β_2 -Integrine sind CD11a-CD18 (auch Lymphozytenfunktions-assoziiertes Antigen (LFA-1)), das für die Adhäsion von Bedeutung ist, oder CD11b-CD18 (auch Makrophagenantigen 1 (MAC-1)), das für das intravaskuläre Kriechen relevant ist (*engl.* intravascular crawling), wie im murinen Modell gezeigt wurde (PHILLIPSON et al., 2006). Beide Integrin-Komplexe binden an endotheliales intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1, *engl.* intracellular adhesion molecule 1), was unerlässlich für die Adhäsion ist und zusätzlich kann MAC-1 aber auch an andere Liganden binden (PETRI et al., 2008; HAYDINGER et al., 2023). Talin 1 bindet

schließlich an eine β -Untereinheit des Integrinkomplexes LFA-1 und sorgt durch eine Konformationsänderung für ein langsames Rollen über das Endothel (KOLACZKOWSKA und KUBES, 2013).

Um zum Entzündungsherd zu gelangen, müssen Neutrophile mithilfe von Integrinen und zellulären Adhäsionsmolekülen (CAM) das Endothel überwinden (KOLACZKOWSKA und KUBES, 2013). Das kann neben der Endothelzelle durch endotheliale Zellverbindungen, zu denen sie aktiv kriechen oder transzellulär durch die Endothelzelle erfolgen (LEY et al., 2007). Während des Kriechens sind Neutrophile ständig der Strömung im Blut ausgesetzt und müssen daher immer fest mit dem Endothel verbunden sein, wenn sie sich weiter Richtung Zellverbindung bewegen (KOLACZKOWSKA und KUBES, 2013). Eine wichtige Rolle dabei spielen dabei Aktin-bindende Proteine, die stark mit den Integrinen interagieren (KOLACZKOWSKA und KUBES, 2013). *In vitro* migrierten Neutrophile am liebsten an den Ecken des Endothels (PETRI et al., 2008; KOLACZKOWSKA und KUBES, 2013). Auch für die Transmigration der Neutrophilen sind Integrine und CAMs wichtig, sowie verschiedene Adhäsionsproteine (KOLACZKOWSKA und KUBES, 2013). Für die transzelluläre Transmigration dagegen werden sogenannte transmigratorische „cups“ gebildet, die sich um die Zelle stülpen und dort „domes“ bilden (PHILLIPSON et al., 2008). Neutrophile bilden LFA-1 auch VLA-4 aus, die an ICAM-1 und VCAM-1 in den Cups binden (PETRI et al., 2008; KOLACZKOWSKA und KUBES, 2013). Nach der Extravasation folgen die Neutrophilen wieder dem Chemokingradienten im Gewebe zum Ort ihrer Bestimmung, wo sie dann ihr Wirken beginnen können (KOLACZKOWSKA und KUBES, 2013).

Bereits im beschädigten Gewebe gehen die meisten Neutrophilen in Apoptose über (FOX et al., 2010). Doch es konnte beobachtet werden, dass ein kleiner Teil der Neutrophilen zurück ins Blut remigrieren kann (WANG et al., 2017). Dieser Vorgang wird als reverse neutrophile Migration bezeichnet, und wurde unter sterilen Bedingungen im Zebrafischembryo entdeckt (MATHIAS et al., 2006). Ob dieser Vorgang physiologischer oder pathologischer Natur ist, ist noch nicht abschließend geklärt. Man geht aber davon aus, dass es zum Beenden der Entzündungsreaktion beiträgt, da die Remigration der Neutrophilen eine schnellere Revaskularisation des Gewebes erlauben (WANG et al., 2017). Eine Studie eines murinen Modells der akuten Lungenentzündung belegte, dass remigrierte Neutrophile zur Abschwächung der

Entzündungsreaktion beitragen (JI et al., 2024). Auf remigrierten Neutrophilen wurde eine signifikant erhöhte Abundanz des Proteins Aconitatdecarboxylase 1 festgestellt, die mit einer reduzierten ICAM-1 Expression, verglichen mit den Neutrophilen aus der Lunge assoziiert wurde, was ähnlich zu den Neutrophilen aus dem peripheren Blut war, die ICAM-1 kaum exprimieren (JI et al., 2024). Da ICAM-1 auf Endothelzellen die Integrin-vermittelte Adhäsion von Neutrophilen ermöglicht, wird vermutet, dass ICAM-1 auf Neutrophilen ebenfalls zu einer Retention im entzündeten Gewebe beiträgt (HAYDINGER et al., 2023; JI et al., 2024).

2.1.4 Abwehrmechanismen der Neutrophilen

Am Ort der Entzündung angekommen, haben Neutrophile ein Repertoire an Abwehrmechanismen gegenüber Pathogenen zur Verfügung um ihrer Aufgabe als Ersthelfer des angeborenen Immunsystems gerecht zu werden (LEBLANC et al., 2024).

2.1.4.1 Oxidativer Burst

Neutrophile werden durch bestimmte Mustererkennungsrezeptoren aktiviert (LEBLANC et al., 2024). Einer der neutrophilen Abwehrmechanismen ist der oxidative Burst, der mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) einhergeht (ROSALES, 2020). ROS werden eingesetzt um Bakterien, wie zum Beispiel *Mycobacterium tuberculosis* abzutöten (JIANG et al., 2025). Neutrophile können experimentell durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) stimuliert werden, was zu einer erhöhten ROS-Produktion führt (DAMASCENA et al., 2022; JOBE et al., 2025). Durch Aktin-Polymerisation wird der Nicotinamid-Adenin-Dinucleotide-Phosphat-Oxidase-Komplex (NOX) in der Zelle zusammengefügt, der dabei eine entscheidende Rolle einnimmt (ROSALES, 2020). Dieser spaltet Nicotinamid-Adenin-Dinucleotide-Phosphat (NADPH) mit Sauerstoff zu NADP⁺, sogenannten Superoxiden und H⁺-Ionen (ROSALES, 2020). Über die Superoxiddismutase (SOD) werden die Superoxide weiter zu Wasserstoffperoxid umgewandelt, welche dann über die Myeloperoxidase weiter zu hypochloriger Säure umgewandelt wird, die sehr effektiv gegen Bakterien ist

(ROSALES, 2020). Dabei wird der SOD auch eine regulatorische Rolle im oxidativen Burst zugeteilt, die die Reaktion von Superoxiden zu Wasserstoffperoxid katalysiert (BRINKMANN et al., 2025). Die NADPH Oxidase ist abhängig von ihren Substraten Sauerstoff und NADPH, welche hauptsächlich über den Pentose-Phosphat-Weg gebildet werden, aber auch durch andere Wege im Glucose-Metabolismus (JOBÉ et al., 2025). Eine Hemmung der NADPH Oxidase führt zu einer signifikant niedrigeren ROS-Produktion (JIANG et al., 2025). Dies kann auch von Bakterien wie *Staphylococcus aureus* genutzt werden, um der Abtötung durch ROS zu entgehen (TOMLINSON et al., 2023).

2.1.4.2 Neutrophile Extrazelluläre Netze (NETs)

Vor mehr als 20 Jahren wurde erstmalig beobachtet, dass aktivierte Neutrophile Fasern aus Chromatin und Granulaproteinen freisetzen und damit an Bakterien binden, um sie schlussendlich zu eliminieren (BRINKMANN et al., 2004). Dieser Vorgang wurde als NETose bezeichnet (BRINKMANN et al., 2004). Heutzutage unterscheidet man zwei NET-Stoffwechselwege: Die suizidale NETose wurde erstmals in humanen Neutrophilen beschrieben und ist ein Prozess, im Rahmen dessen die Zelle zugrunde geht (FUCHS et al., 2007; PAPAYANNOPOULOS, 2018). Diese Art der NETose wird auch als NOX-abhängig bezeichnet, da sie durch den NOX-Komplex ausgelöst wird (WANG et al., 2024a). Der NOX-Komplex ist an der Bildung von ROS beteiligt (WANG et al., 2024a). Dadurch wird deutlich, dass der oxidative Burst und die NETose eng miteinander verbunden sind. ROS aktiviert in der Zelle die Myeloperoxidase (MPO) und sorgt für eine Translokation der neutrophilen Elastase (NE) in den Zellkern (WANG et al., 2024a). Beide Proteine sind für die Dekondensation von Chromatin verantwortlich (WANG et al., 2024a). Ein anderer Mechanismus, der eine Chromatindekondensation ermöglicht, ist die Histon-Citrullination die durch die Protein-Arginin-Deiminase (PAD) Typ 4 erfolgt (PAPAYANNOPOULOS, 2018). Parallel dazu ist die nicht-lytische NETosis beschrieben (WANG et al., 2024a). Dies wurde erstmals an humanen Neutrophilen beobachtet, die mit *Staphylococcus aureus* infiziert wurden (PILSCZEK et al., 2010). Die nicht-lytische NETose wird als NOX-unabhängig beschrieben (WANG et al., 2024a). Die Desoxyribonukleinsäure (DNS) wird hierbei durch Vesikel extrazellulär befördert, ohne die Zelle dabei zu zerstören

(WANG et al., 2024a). Während die NETose primär der Erregerbekämpfung dient, kann sie im Falle einer Fehlregulation oder Überstimulation auch das körpereigene Gewebe schädigen (WIGERBLAD und KAPLAN, 2023). Die NETose ist daher mit mehreren Autoimmunkrankheiten assoziiert (LEE et al., 2017). So zum Beispiel mit der ERU (FINGERHUT et al., 2019; FINGERHUT et al., 2022). Dabei konnte im Serum von an ERU erkrankten Pferden deutlich mehr freie DNS und relative Nuklease-Aktivität, die als NET-Marker verwendet wurden, detektiert werden, als im Serum von gesunden Pferden (FINGERHUT et al., 2019). Das lässt sich dadurch erklären, dass Neutrophile von an ERU erkrankten Pferden, in einem präaktivierten Zustand vorliegen (WEIGAND et al., 2021). Weitere NET-Marker wurden neben dem Serum auch in der Glaskörperflüssigkeit von an ERU erkrankten Pferden gefunden (FINGERHUT et al., 2022). Einige NET-Markern wurden sogar in Zusammenhang mit dem Schweregrad der ERU gebracht (FINGERHUT et al., 2022). Das könnte darauf beruhen, dass NETs einen zytotoxischen Effekt auf die Blut-Retina-Schranke haben, was in der Studie von Fingerhut et. al. mit isolierten humanen NETs und einer humanen Zelllinie, die die Blut-Retina-Schranke repräsentierte, gezeigt werden konnte (FINGERHUT et al., 2022). Im Zusammenhang mit der NETose steht auch die rheumatoide Arthritis (RA) (WIGERBLAD und KAPLAN, 2023; WANG et al., 2024a). Hier konnte schon vor einem Jahrzehnt festgestellt werden, dass die IgA Komplexe, die bei dieser Krankheit gebildet werden, eine fehlregulierte NETose auslösen (ALEYD et al., 2016). Eine aktuelle Studie hat dabei ergeben, dass bei einer Kombination aus RA und interstitieller Pneumonie, Patienten eine erhöhte Bildung von NETs aufweisen (XUE et al., 2025). Dies führt zu einer Förderung der Differenzierung von MRC-5-Zellen in Myofibroblasten, womit wiederum eine Lungenfibrose begünstigt wird (XUE et al., 2025). Daher wird in dieser Studie eine medikamentöse Beeinflussung der NETose als Therapieoption vorgeschlagen (XUE et al., 2025).

2.1.4.3 Freisetzung von Granula

Die Granula von humanen Neutrophilen werden bereits im Knochenmark während der Granulopoese gebildet (BORREGAARD et al., 1995). Die ersten gebildeten Granula werden als azurophile Granula bezeichnet (FAURSCHOU und BORREGAARD, 2003). Sie enthalten vor allem Myeloperoxidase, Defensine, Elastase und Azurocidin

(EICHELBERGER und GOLDMAN, 2020; ROSALES, 2020). Danach entstehen die spezifischen Granula, die Lysozyme wie Lactoferrin und Gelatinase enthält (EICHELBERGER und GOLDMAN, 2020). Diese wirken vor allem antimikrobiell (LEBLANC et al., 2024). Die gelatinasehaltige Granula werden in den stabkernigen Neutrophilen gebildet und enthalten überwiegend Gelatinasen, wie Metalloproteinasen, aber auch einen kleinen Teil an Lactoferrin (EICHELBERGER und GOLDMAN, 2020; ROSALES, 2020). Die sekretorischen Vesikel werden erst zuletzt im bereits ausgereiften Neutrophilen gebildet (FAURSCHOU und BORREGAARD, 2003). Sie enthalten Plasmaproteine und membran-assoziierte Rezeptoren, die eine wichtige Rolle bei der Entzündungsreaktion einnehmen (FAURSCHOU und BORREGAARD, 2003; EICHELBERGER und GOLDMAN, 2020; LEBLANC et al., 2024). Nach Aktivierung der Neutrophilen degranulieren zuerst die sekretorischen Vesikel, danach erfolgt die Ausschüttung der übrigen Granulatypen entgegen der Reihenfolge der Granulopoese (ROSALES, 2020). Die Degranulation kann an der Plasmamembran extrazellulär erfolgen oder intrazellulär in ein Phagosom entlassen werden (EICHELBERGER und GOLDMAN, 2020). Dabei ist zu beachten, dass, wie bei der ROS und NETs-Bildung, auch bei der Degranulation Gewebeschäden durch das Entlassen von Granula aus der Zelle entstehen können (EICHELBERGER und GOLDMAN, 2020). Im Kontext mit autoimmunen Erkrankungen wurde bei einer Proteomanalyse von gesunden und an ERU erkrankten equinen Neutrophilen festgestellt, dass der Stoffwechselweg der neutrophilen Degranulation bei ERU erhöht ist (WEIGAND et al., 2021). Insgesamt wurden 9 Proteine gefunden, die mit der Degranulation assoziiert und in ERU höher abundant waren (WEIGAND et al., 2021). Hervorzuheben ist das Calgranulin B, dass eine über 18-fach erhöhte Expression zeigte und mit dem Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke in Verbindung stehen könnte (WEIGAND et al., 2021). Bei einem akuten ischämischen Schlaganfall konnten ebenfalls hochregulierte Proteine in humanen Neutrophilen nachgewiesen werden, die die Degranulation fördern (LI et al., 2025a). Die hochregulierten Proteine Synaptotagmin-9, SH3 Domäne-bindendes Protein-1 und Syntaxin-bindendes Protein 1 werden von der Histon-Deacetylase 2 regulatorisch beeinflusst, welches wiederum so auch die Degranulation in diesem Krankheitsmodell beeinflusst (LI et al., 2025a). Der Mechanismus der Degranulation erfolgt durch Stimulation der Zellen. Dadurch bewegen sich die Granula Richtung Phagosom oder Plasmamembran (LACY, 2006).

Dort verbinden sie sich mit der Membran, um dort eine Pore zu bilden, in die sie schließlich ihre Granula entlassen können. Dieser Prozess wird Exozytose genannt (LACY, 2006), ein Prozess der über die Snap Rezeptoren (SNARE) und RAB Proteine wird die Vesikelausschüttung kontrolliert wird (ROSALES, 2020). Je nach Vesikeltyp werden unterschiedliche SNARE Komplexe gebildet (ROSALES, 2020). Diese Komplexe bestehen aus den SNAREs und den Vesikel-assoziierten Membranproteinen (LACY, 2006). In Folge darauf kommt es zu einer Fusion und schließlich zur Degranulation (LACY, 2006).

2.1.4.4 Phagozytose

Die Phagozytose ist ein Rezeptor-vermittelter Prozess, bei dem Pathogene in einer Vakuole, die als Phagosom bezeichnet wird, eingeschlossen werden, um sie zu beseitigen (ROSALES, 2020). Neutrophile erkennen diese Pathogene an Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs, *engl.* pathogen-associated molecular patterns oder durch Opsonierung (VAN KESSEL et al., 2014; ROSALES, 2020; BURN et al., 2021). Durch die Aktivierung von phagozytotischen Rezeptoren verändert sich das Aktinskelett und die Zellmembran, um das Phagosom zu formen (ROSALES, 2020). Das humane Phagosom fusioniert dann mit den sekretorischen Vesikeln (FINGERHUT et al., 2020). Durch die Entlassung der Granula in das Phagosom wird der pH gesenkt. Nach einer weiteren Verschmelzung mit Lysosomen, wird dadurch das Phagolysosom gebildet (ROSALES, 2020). An der Membran des Phagolysosoms baut sich nun die NADPH Oxidase zusammen und startet die Produktion von ROS (VAN KESSEL et al., 2014). Darüber hinaus sinkt der pH im Phagolysosom weiter (ROSALES, 2020). Kalium-Influx sorgt für die Freisetzung von Serin-Proteasen (ROSALES, 2020). Außerdem produziert die MPO HOCl, das eine bakterizide Wirkung hat (ROSALES, 2020). Durch diese Prozesse werden die phagozytierten Pathogene schließlich zerstört (VAN KESSEL et al., 2014).

2.1.5 Heterogenität und Immunmodulation von Neutrophilen

Momentan ist die Heterogenität von Neutrophilen ein sehr stark diskutiertes Thema. Viele Unterschiede konnten in der Population der Neutrophilen festgestellt werden. Diese beziehen sich auf Merkmale wie das Alter, die Dichte, die Expression von Oberflächenmarkern oder auch funktionelle Eigenschaften von Neutrophilen im physiologischen und pathologischen Zustand (HE et al., 2025). Durch Single-Cell-RNA-Sequencing ist es nun möglich dieser Frage genauer auf den Grund zu gehen (WIGERBLAD et al., 2022). In einer Studie wurde entdeckt, dass humane Neutrophile auf transkriptorischer Ebene heterogen sind (WIGERBLAD et al., 2022). Daraus konnten vier Subklassen von Neutrophilen eingeteilt werden, die immaturen, transitionalen, transkriptional inaktiven und transkriptional aktiven Neutrophilen (WIGERBLAD et al., 2022). In einer weiteren Studie wurden humane Neutrophile aus Kolonbiopsien von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen isoliert und durch Single-Cell-RNA-Sequencing wurde ebenfalls eine Heterogenität dieser Zellen nachgewiesen (GARRIDO-TRIGO et al., 2023). Es konnten drei Arten von Neutrophilen unterschieden werden, die jeweils unterschiedliche Marker und Oberflächenstrukturen exprimieren (GARRIDO-TRIGO et al., 2023). Neutrophile Heterogenität spielt auch bei Autoimmunkrankheiten wie dem proliferativem Lupus nephritis eine Rolle (OSTENDORF et al., 2025). Hier konnte erst kürzlich eine Population aktivierter Neutrophiler mithilfe des lysosomal assoziierten Membranprotein 1 identifiziert werden, dass auf den Zellen nach Stimulation vermehrt auf der Zelloberfläche exprimiert wird, obwohl es von erkrankten Neutrophilen nicht mehr exprimiert wird als in den Kontrollen (OSTENDORF et al., 2025). Daher dient das lysosomal assoziierte Membranprotein 1 als Marker für die Subpopulation der aktivierten Neutrophilen in proliferativem Lupus nephritis (OSTENDORF et al., 2025). Eine weitere Subklasse der Neutrophilen konnte bereits vor einigen Jahrzehnten in Patienten mit Systemischem Lupus erythematosus (SLE), RA und akutem rheumatischem Fieber festgestellt werden (HACBARTH und KAJDACSZY-BALLA, 1986). Die sogenannten „low density neutrophils“ (LDNs) sind eine Gruppe von Neutrophilen, die im Gegensatz zu den anderen Neutrophilen bei der Dichtegradientenzentrifugation in der Schicht mit den peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC, *engl.* peripheral blood mononuclear cells) verbleiben (HASSANI et al., 2020). Der Grund dafür ist ihre niedrigere Dichte im Vergleich zu den übrigen

Neutrophilen (HASSANI et al., 2020). LDNs werden mit verschiedenen humanen Krankheitsbildern assoziiert (SCAPINI et al., 2016). Vermehrte LDNs und damit auch die vermehrte Produktion von NETs, treten zum Beispiel bei inkompletten SLE- und SLE- Patienten auf (HENNING et al., 2025). In geringer Menge treten LDNs auch im Blut von gesunden Menschen auf (BLANCO-CAMARILLO et al., 2021). Neben ihrer geringeren Dichte wurde eine erhöhte ROS-Produktion und eine erhöhte Phagozytose-Kapazität festgestellt (BLANCO-CAMARILLO et al., 2021). Ferner existiert eine Studie beim Pferd, die das Vorhandensein von LDNs beim gesunden Pferd nachgewiesen hat. (HERTEMAN et al., 2017). Zudem konnte in derselben Studie gezeigt werden, dass bei asthmatischen Pferden vermehrt LDNs auftreten. Es wurde gezeigt, dass LDNs deutlich reifer sind und mehr NETs produzieren als die Neutrophile mit höherer Dichte (HERTEMAN et al., 2017). Analog zu den Pferden, konnten auch bei gesunden Menschen LDNs nachgewiesen werden (BLANCO-CAMARILLO et al., 2021). Beim Vergleich von LDNs mit den HDNs von gesunden Spendern konnte festgestellt werden, dass LDNs auch bei gesunden Individuen in kleinerer Anzahl im Blut zu finden sind (BLANCO-CAMARILLO et al., 2021). Außerdem zeigten LDN eine vermehrte ROS-Produktion und eine erhöhte phagozytische Kapazität (BLANCO-CAMARILLO et al., 2021). Myasthenia gravis gehört ebenfalls zu den Krankheiten bei denen beim Menschen vermehrt LDNs festgestellt wurden und positiv mit der Schwere der Krankheit assoziiert wurden (ZHANG et al., 2025). Zudem konnte auch gezeigt werden, dass LDNs vor allem durch kontaktabhängige Mechanismen, wie beispielsweise mit Komponenten aus NETose eine proinflammatorische Th1- und Th17-Zell-Antwort und somit auch das adaptive Immunsystem beeinflussen können (ZHANG et al., 2025). Neutrophile interagieren aber nicht nur mit dem adaptiven Immunsystem, sondern mit vielen anderen Immunzellen, um deren Funktionen zu modulieren (MANTOVANI et al., 2011). Sie entlassen zum Beispiel granuläre Proteine, um Monozyten und dendritische Zellen anzulocken und auszureifen (HE et al., 2025). Mit humanen Neutrophilen wurde zudem gezeigt, dass Neutrophile die Fähigkeit besitzen Antigene über den MHC-II-Komplex für CD4+T-Zellen zu präsentieren und damit vermutlich als atypische Antigenpräsentierende Zellen auch eine Rolle in der Antigen-spezifischen T-Zell Antwort spielen (VONO et al., 2017).

2.2 Glykosylierungen

2.2.1 Definition und Entstehung von Glykosylierungen

Nach der Translation gibt es für Proteine noch einen weiteren Vorgang, der für deren Funktionalität unerlässlich ist. Dieser Prozess wird als post-translationale Modifikation (PTM) bezeichnet (TIAN et al., 2025). Der Vorgang der PTM findet im endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat statt (ZHANG und WANG, 2016; SCHJOLDAGER et al., 2020). Es gibt verschiedene Formen der PTM, so zum Beispiel Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung und einige weitere (BRADLEY, 2022; TIAN et al., 2025). Eine der häufigsten PTMs ist die Glykosylierung (ZHANG und WANG, 2016; BRADLEY, 2022). Dabei werden verschiedenste Zuckerstrukturen durch Glycosyltransferasen kovalent an bestimmte Aminosäurereste des Proteins gebunden (SCHJOLDAGER et al., 2020; TIAN et al., 2025). Die Glykosylierungen können in Untergruppen eingeteilt werden, je nachdem welche Aminosäure als Bindungspartner für die jeweilige Glykanstruktur dient (ZHANG und WANG, 2016; TIAN et al., 2025). Die C-Mannosylierung und die Glykosylphosphatidylinositol (GPI) vermittelte Membranverankerung kommen eher selten vor (TIAN et al., 2025). Die C-Mannosylierung beschreibt die Anheftung eines Mannosylmoleküls an die C-Position von Tryptophan (DOUCEY et al., 1998). In einer Studie mit einer humanen testikulären Keimzelltumorzelllinie, wurde eine C-Mannosylierung dieser Zellen beschrieben sowie der regulatorische Einfluss der C-Mannosylierung auf ein krankheitsassoziiertes Protein (KOBAYASHI et al., 2025). Jedoch wurde die C-Mannosylierung bisher nicht auf Neutrophilen beschrieben (Stand der PubMed-Recherche: 03.09.2025). Die GPI vermittelte Membranverankerung ist durch die Anheftung eines GPI-Ankers an ein C-terminales Ende charakterisiert (KINOSHITA und FUJITA, 2016; SCHJOLDAGER et al., 2020). Ein GPI-Anker ist beispielsweise auf verschiedenen Proteinen der Plasmamembran zu finden, wo sie an Adhäsionsmoleküle, Zelloberflächenrezeptoren oder Hydrolasen als Glykosylierung dienen (ORLEAN und MENON, 2007). Experimentell konnte gezeigt werden, dass das α -Toxin von *Clostridium septicum* an diese mit einem GPI-Anker glykosylierten Proteine binden kann und darüber hinaus über einen Immunsensor eine schwere Entzündungsreaktion auslösen kann (JING et al., 2022).

Sehr häufig sind dagegen die N- und die O-Glykosylierungen. Bei der N-

Glykosylierung werden N-Glykane an Asparagin gehängt, dagegen werden bei der O-Glykosylierung O-Glykane an Serin, Threonin oder Tyrosin gebunden (STEENTOFT et al., 2011; TIAN et al., 2025). Sowohl N- als auch O-Glykosylierungen gibt es in sehr vielen verschiedenen Ausführungen (HE et al., 2024). An die Verankerung am Asparagin ist bei allen N-Glykosylierungen eine N-Acetylglucosaminmannose gebunden (MEDZIHRAJSZKY et al., 2015). Dies wird von der Oligosaccharyltransferase katalysiert, die aus mehreren Untereinheiten besteht (HIRATA und KIZUKA, 2021). In einer Studie, die das Glykoproteom von Granulaproteinen von humanen Neutrophilen analysiert hat, konnte gezeigt werden, dass die Untereinheiten der Oligosaccharyltransferase in frühen neutrophilen Vorläuferzellen stark exprimiert sind und mit der großen Anzahl an Glykosylierungen in der azurophilen Granula korreliert sind (KAWAHARA et al., 2023). Des Weiteren wurde auch die N-Glykosylierung weiterer Zellorganellen von Neutrophilen charakterisiert und miteinander verglichen, wodurch eine spezifische Beschreibung des N-Glykoms von Neutrophilen unter physiologischen Gegebenheiten entstanden ist (KAWAHARA et al., 2023). In Neutrophilen spielen N-Glykosylierungen eine wichtige Rolle bei der Ausübung ihrer Funktionen (UGONOTTI et al., 2021). Beispielsweise ist die N-Glykosylierung essenziell für die enzymatische Aktivität der neutrophilen Myeloperoxidase, was in einer humanen und einer Hamster-Zelllinie gezeigt wurde (VAN ANTWERPEN et al., 2010). Eine abweichende N-Glykosylierung ist dagegen oft mit Krankheiten assoziiert (SCHJOLDAGER et al., 2020). In humanen Brustkrebszellen wurde festgestellt, dass diese Zellen eine höhere Abundanz von N-glykosyliertem CD24 zeigten als die Kontrollzellen (WANG et al., 2025). Zudem konnte herausgefunden werden, dass die STT3-Untereinheit des Oligosaccharyltransferasekomplexes eine entscheidende Rolle für die aberrante N-Glykosylierung von CD24 in Brustkrebszellen spielte (WANG et al., 2025). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die aberrante N-Glykosylierung die Ferroptose, eine eisenabhängige Art des Zelltods, inhibiert und damit eine Resistenz gegen Paclitaxel, einem chemotherapeutischen Medikament, bewirkt. (WANG et al., 2025). Dies ist nur ein Beispiel, welche wichtige Rolle N-Glykosylierungen im Körper haben (HE et al., 2024). Aber auch dafür, dass eine aberrante Glykosylierung schwerwiegende Folgen haben kann (RADOVANI und GUDELJ, 2022).

Die O-Glykosylierung kann grundsätzlich in 11 Arten unterschieden werden

(SCHJOLDAGER et al., 2020). Eine der häufigsten Arten ist das O-glykosidisch gebundene N-Acetylgalaktosamin (GalNAc), die auch als Muzin-Typ O-Glykosylierung bezeichnet wird (HE et al., 2024). Initiiert wird dies durch eine Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferase (GALNT), die GalNAc O-glykosidisch an die jeweilige Aminosäure bindet (HE et al., 2024). GALNTs erzeugen ein GalNAc α 1-O-Serin oder Threonin, das auch als Thomsen nouvelle (Tn)-Antigen bezeichnet wird (SCHJOLDAGER et al., 2020). Das Tn-Antigen ist die Vorstufe von 8 Core-Strukturen, die durch Hinzufügen weiterer Zuckerstrukturen und Sialylierungen entstehen (CULL et al., 2025). Das Tn-Antigen ist kaum im gesunden humanen Gewebe, aber ist oft auf verschiedensten Tumorzellen zu finden (FU et al., 2016). In einer Studie, die Tn-Antigen exprimierende Brustkrebszellen über einen genetischen Knockout erzeugt hat, wurde festgestellt, dass das Tn-Antigen Metastasen förderte (LI et al., 2023). Für die Core-1-Struktur von O-Glykanen, die auch als T-Antigen bezeichnet wird, wird über die Core-1-Synthase eine β 1,3-gebundene Galaktose ergänzt (CULL et al., 2025). Core-1-O-Glykane auf Neutrophilen konnten in der Maus als wichtiger Bindungspartner für das E-Selektin identifiziert werden, dass für die Anheftung und das Rollen über das Endothel entscheidend ist (siehe Kapitel 2.3.1) (YAGO et al., 2010). Eine höhere Abundanz der Core-1-Synthase konnte dagegen in humanen gastrointestinalen und urogenitalen Tumorzellen festgestellt werden, was positiv mit der Tumorpheriferation und Metastasen assoziiert wurde (KALEMOGLU und CANER, 2025). Durch das Ergänzen eines β 1,6-gebundenen N-Acetylglucosamins (GlcNAc) entsteht aus der Core-1-Struktur die Core-2-Struktur (CULL et al., 2025). Die Core-3-, Core-4- und Core-6-Strukturen entstehen jeweils durch die Verlängerung mit ein oder zwei β -gebundenen GlcNAc und Core-5 und Core-7 durch die Ergänzung eines α -gebundenen GalNAc. Bei der Core-8-Struktur wird eine α 1-3-gebundene Galaktose mit dem Tn-Antigen verknüpft (CULL et al., 2025).

2.2.2 Funktionen von Glykosylierungen

Die Glykosylierung von Proteinen ist ein unerlässlicher Prozess, da sie enorm wichtig für deren Funktion ist (SCHJOLDAGER et al., 2020). Schon in der Proteinfaltung spielt die Glykosylierung eine tragende Rolle (HE et al., 2024). Diese findet im ER statt (SCHJOLDAGER et al., 2020). Die N-Glykosylierung erleichtert die Proteinfaltung,

indem sie die Polypeptidstruktur stabilisiert (HELENIUS und AEBI, 2004). Zudem ermöglichen sie die Interaktion von Glykoproteinen mit Lektinchaperonen wie Calnexin und Calretikulin, die ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung spielen (HELENIUS und AEBI, 2004). Die Protein UDP-Glukose Glykoprotein-Glukosyltransferase 1 (UGGT1) kann un stabile oder fehlgefaltete Glykoproteine reglykosylieren, die dadurch von Lektinchaperonen erkannt werden und so der Degradation im ER entgehen können (LAMRIBEN et al., 2016; NINAGAWA et al., 2024). Die UGGT1 reguliert damit welche Proteine gefaltet werden und welche Proteine degradiert werden und agiert somit als Kontrolle der Proteinqualität, was durch eine genetische Modifikation des UGGT1 in einer humanen Zelllinie gezeigt werden konnte (NINAGAWA et al., 2024). Eine andere wichtige Funktion der Glykosylierung ist die Regulation der Zelladhäsion (HE et al., 2024). Vor allem Oberflächenproteine sind oft stark glykosyliert, (HE et al., 2024). In Kapitel 2.2.1 wurde bereits erwähnt, dass die O-Glykosylierung auf Neutrophilen eine Bindung an das E-Selektin und somit an Endothelzellen ermöglicht (YAGO et al., 2010). Dabei ist zu beachten, dass auch die Glykosylierung ein sehr dynamisches Geschehen ist (TIAN et al., 2025). So konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von Epidermalem Wachstumsfaktor zu humanen Brustkrebszellen eine Desialylierung durch Neutramidasen von Plasmamembranproteinen erfolgte und dadurch auch deren Endozytose zurück zum Golgi-Apparat (MACDONALD et al., 2025). Dort konnten die Plasmamembranproteine wieder entsprechend glykosyliert werden (MACDONALD et al., 2025). Glykosylierte Oberflächenstrukturen werden von Glykan-bindenden Proteinen erkannt (HE et al., 2024). Dazu zählen unter anderen die Galektine (GAL), die Siglecs und die Selektine (SCHJOLDAGER et al., 2020; HE et al., 2024). In verschiedenen murinen Knockout-Modellen wurde bereits bewiesen, dass die O-glykosylierten, terminal sialylierten Glykoproteine PSGL -1, CD43 und CD44, die auf Neutrophilen zu finden sind, mit den „Lipid Rafts“ über ihre Glykosylierung in Verbindung stehen (SHAO et al., 2015). Die „Lipid Rafts“ fungieren dabei als wichtiger Teil der Signaltransduktion (SIMONS und TOOMRE, 2000). Die Bindung von „Lipid Rafts“ und Glykoproteinen ist notwendig, um eine Signaltransduktion durch ein Selektin zu ermöglichen (SHAO et al., 2015). Daneben können auch Galektine über eine Glykan-Bindung Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems modulieren (LIU und STOWELL, 2023). Die Expression von Galektin 1 (GAL1) konnte

mit vermehrtem Auftreten von als tumorprogressiv geltenden myeloischen Suppressorzellen in Verbindung gebracht werden (BLIDNER et al., 2025). Diese myeloischen Suppressorzellen werden dabei in Monozytenähnliche und Neutrophilenähnliche eingeteilt (BLIDNER et al., 2025). Bei den Suppressorzellen wurde eine nischenabhängige Glykosylierung festgestellt, die vermehrt asialo-Core 1 O-Glykane, komplexe β 1-6-verzweigte Glykane und verlängerte N-Acetyllaktosamin (LacNAc)-Reste zeigte (BLIDNER et al., 2025). Dadurch werden die immunregulierenden und proangiogenen Fähigkeiten der myeloischen Suppressorzellen verstärkt, was insgesamt einen tumorprogressiven Effekt hat. Das Glykoprotein CD177, das auf Neutrophilen vorkommt, besitzt ebenfalls immunregulierende Eigenschaften (HUANG et al., 2025). Das auf der Neutrophilenoberfläche exprimierte Glykoprotein wird durch eine Sialyltransferase sialyliert und hat eine antiinflammatorische Wirkung (HUANG et al., 2025). Dieses wurde sowohl in humanen als auch in murinen Neutrophilen nach einer Verletzung des zentralen Nervensystems experimentell nachgewiesen (HUANG et al., 2025). CD177 ist N-glykosyliert und bereits 1992 wurde festgestellt, dass nur eine Subpopulation der humanen Neutrophilen dieses N-glykosylierte Protein trägt (GOLDSCHMEDING et al., 1992). Mit Hilfe der Einzelzell-RNA-Sequenzierung wurde die Subklasse der CD177+-Neutrophilen bestätigt, sowie die abundante Expression von antiinflammatorischen Genen (HUANG et al., 2025). Zusammengefasst deutet dies darauf hin, dass Glykosylierungen durch ihre Funktionen auch eine Unterscheidung in Subklassen zulassen.

2.2.3 Einsatz von Pflanzenlektinen zum Nachweis von Glykosylierungen

Um Glykosylierungen genau erforschen zu können, müssen sie nachgewiesen beziehungsweise markieren werden. Aufgrund ihrer immer größer werdenden Bedeutung, gibt es zahlreiche Techniken, um das Glykom besser erforschen zu können. Pflanzenlektine sind ähnlich den körpereigenen Lektinen glykanbindende Proteine, die aufgrund ihrer Spezifität zum Nachweis spezifischer Glykane verwendet werden (MANNING et al., 2017). Einige Einsatzmöglichkeiten von Pflanzenlektinen zum Nachweis bestimmter Glykanstrukturen werden im Folgenden vorgestellt:

Die Durchflusszytometrie ist eine geeignete Methode um Glykosylierungen mittels spezifischer, glykanbindender Pflanzenlektine auf der Oberfläche von Zellen zu messen (MOREL et al., 2022). Die Anwendung einer lektinbasierten Durchflusszytometrie kann unterschiedliche Ziele verfolgen. Beispielsweise kann über die Bindung von mehreren Pflanzenlektinen mit unterschiedlichen Bindungsspezifitäten die Oberflächenglykosylierung von Immunzellen charakterisiert werden (MOREL et al., 2022). In einer Studie, die humane B-Zellen von gesunden, an systemischen Lupus Erythematosus (SLE) und primärem Sjögrens Syndrom erkrankten Patienten untersucht hat, konnte durch Anwendung von 12 Pflanzenlektinen festgestellt werden, welche Glykosylierungen auf der Oberfläche von gesunden B-Zellen zu finden sind und dass sich die Oberflächenglykosylierung bei den B-Zellen aus den Krankheitsmodellen verändert hat (MOREL et al., 2022). Zudem kann über die pflanzenlektinbasierte Durchflusszytometrie auch untersucht werden, wie sich die Oberflächenglykosylierung während eines Prozesses verändert, wie es bei der Differenzierung von humanen B-Zellen gezeigt werden konnte (GIOVANNONE et al., 2018). Eine sehr spezifische Anwendung von Pflanzenlektinen in der Durchflusszytometrie wurde in einem Konsensusprotokoll für die Quantifizierung der Thrombozytendesialylierung vorgeschlagen (KAUSKOT et al., 2025). Da die Desialylierung essenziell für die Funktion der Thrombozyten ist, gilt sie als diagnostischer Biomarker. Diese konnte mittels der Pflanzenlektine RCA-1 und ECL in der Durchflusszytometrie quantifiziert werden (KAUSKOT et al., 2025). Des Weiteren können Pflanzenlektine auch angewendet werden, um die Glykosylierung von Glykoproteinen auf der Zelloberfläche zu charakterisieren (KELM et al., 2020). Beispielsweise wurden in einer Studie Phaseolus Vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E) und Galanthus Nivalis Lektin (GNL) angewendet, um mittels Durchflusszytometrie Unterschiede in der Glykosylierung auf humanen Neutrophilen durch Stimulierung zu zeigen (KELM et al., 2020). Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Pflanzenlektine spezifisch an Glykane des humanen CD11b/CD18 binden (KELM et al., 2020). Während über eine pflanzenlektinbasierte Durchflusszytometrie quantitative Aussagen über Glykosylierungen generiert werden können, kann die Bindung eines Pflanzenlektins an ein spezifisches Glykan auf einer Zelle durch eine Immunzytologie oder Immunhistologie visualisiert werden (MANNING et al., 2017). So wurden verschiedene Pflanzenlektine zur Charakterisierung extrazellulärer

Matrixstrukturen im somatosensorischen Kortex und im Hippocampus von Mäusen verwendet, um diese nachzuweisen (UENO et al., 2025). Mit derselben Methode konnten zudem die Sialylierung von Müllerzellen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden mithilfe der Pflanzenlektine *Maackia amurensis leukoagglutinin*, *Maackia amurensis hemoagglutinin* und *Sambucus nigra lectin* nachgewiesen werden (LORENZ et al., 2021).

2.2.4 Bedeutung von aberranten Glykosylierungen bei autoimmunen Krankheitsbildern

Im Vorherigen Kapitel wurde dargelegt, weshalb Glykosylierungen eine wichtige Rolle spielen und mit welchen pflanzenlektinbasierten Methoden sie nachweisbar sind. In diesem Kapitel werden autoimmune Krankheitsbilder vorgestellt, die mit einem veränderten Glykosylierungsmuster assoziiert sind. Die ERU ist eine Autoimmunerkrankung des Pferdes, bei der ein abweichendes Glykosylierungsmuster auf an ERU erkrankten retinalen Müllerzellen entdeckt wurde (LORENZ et al., 2021). Da in der Massenspektrometrie festgestellt wurde, dass die Sialidase Neuraminidase 1 höher abundant ist, wurde über die Bindung von Pflanzenlektinen gezeigt, dass Müllerzellen von an ERU erkrankten Pferden signifikant weniger α 2,3- und α 2,6-Sialylierungen tragen als die gesunden Müllerzellen (LORENZ et al., 2021). Die genaue Bedeutung der retinalen Desialylierung konnte dabei nicht aufgeklärt werden (LORENZ et al., 2021). In den Leukozyten aus dem peripheren Blut von an ERU erkrankten Pferden ist bisher keine mit der Krankheit assoziierte Glykosylierung beschrieben worden (Stand der PubMed-Recherche: 05.09.2025), allerdings finden sich Berichte über veränderte Glykosylierungen von Leukozyten bei anderen autoimmunen Krankheitsbildern. So wurden in einer Studie bei aus SLE-Patienten isolierte Immunzellen veränderte Glykosylierungen im Vergleich zu gesunden Probanden festgestellt (SZABO et al., 2024). Einige T-Zellklassen von SLE-Patienten exprimieren nach *in vitro* Stimulation signifikant mehr α 2,6-Sialylierung und ebenfalls signifikant mehr Core Fukosylierung gegenüber den unstimulierten SLE-T-Zellen und den T-Zellen von gesunden Probanden (SZABO et al., 2024). Festgestellt wurde das über eine lektinbasierte Durchflusszytometrie, indem das Pflanzenlektin SNA verwendet wurde um die α 2,6-Sialylierung und das *Aleuria aurantia Pflanzenlektin*

(AAL) um Core Fukosylierungen zu binden (BOJAR et al., 2022; SZABO et al., 2024). Eine ebenfalls signifikant höher abundante Core Fukosylierung zeigten unstimulierte Plasmablasten (SZABO et al., 2024). Dagegen konnte eine signifikant niedriger abundante Core Fukosylierung in doppelt negativen natürlichen Killer-T-Zellen, stimulierten B-Gedächtniszellen und stimulierten Monozyten festgestellt werden (SZABO et al., 2024). Bei den doppelt negativen natürlichen Killer-T-Zellen und den stimulierten wie auch unstimulierten B-Gedächtniszellen waren zudem die α 2,6-Sialylierung signifikant niedriger (SZABO et al., 2024). Generell wurde festgestellt, dass eine vermehrte Glykosylierung durch höher abundante α 2,6-Sialylierung und Core Fukosylierung meist positiv mit der Krankheitsaktivität von SLE korreliert (SZABO et al., 2024). Die genauen Auswirkungen dieser veränderten Glykosylierungen, konnten dabei nicht aufgedeckt werden (SZABO et al., 2024). In der Studie von Szabo et al. wurde die Glykosylierung einiger Immunzellen in Bezug auf der Autoimmunerkrankung SLE analysiert, allerdings wurden in dieser Studie nicht die Glykosylierung von Neutrophilen untersucht, obwohl festgestellt wurde, dass diese Zellen an der SLE beteiligt sind (AMBLER und KAPLAN, 2024; WU et al., 2025b).

2.3 Equine rezidivierende Uveitis (ERU)

2.3.1 Definition und Klinik der ERU

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist einer der häufigsten Gründe für eine ein- oder beidseitige Erblindung beim Pferd (DEEG et al., 2002b; GILGER, 2010). Im europäischen Raum sind ungefähr bei 8-10% der Pferde von der ERU betroffen (SPIESS, 2010), in den USA sogar zwischen 2 und 25% (GILGER, 2010). Typische Symptome einer akuten Uveitis sind Blepharospasmen, Epiphora, Vaskularisation in Richtung der Kornea, Kornealödem, Miosis und eine Trübung der Glaskörperflüssigkeit (DEEG et al., 2004; GILGER und MICHAU, 2004; WOLLANKE et al., 2022). Zusätzlich sind weitere Symptome wie Kataraktbildung, eine dauerhafte Trübung der Glaskörperflüssigkeit, Synechien, Keratitis, Sehverlust und Atrophie des betroffenen Auges sehr hinweisend auf eine ERU (GILGER und MICHAU, 2004; GILGER, 2010; WOLLANKE et al., 2022). Letztendlich kann aber nur dann von einer

ERU gesprochen werden, wenn mindestens zweimal eine akute Uveitis, auch „Uveitisschub“ genannt, nachgewiesen wurde (GILGER et al., 2022).

Nach Gilger und Michau gibt es drei verschiedene Arten der ERU: Die klassische, die schleichende (*engl.* insidious) und die posteriore ERU (GILGER und MICHAU, 2004). Die klassische Uveitis ist durch periodische aktive Uveitis-Schübe, die wiederum von Ruhephasen unterbrochen werden, gekennzeichnet (GILGER und MICHAU, 2004; MCMULLEN und FISCHER, 2017). In der aktiven Uveitis sind Iris, Zilliarkörper und Choroid entzündet, zusätzlich sind Kornea, vordere Augenkammer, Linse, Retina und der Glaskörper oft mitbeteiligt (MCMULLEN und FISCHER, 2017; GILGER et al., 2022). Nach jeder Ruhephase folgt meist ein stärkerer Schub (GILGER und MICHAU, 2004). Diese aufeinanderfolgenden Uveitis-Schübe führen zu Kataraktbildung, intraokulären Adhäsionen, Phthisis bulbi (Atrophie des Auges) und schlussendlich zur Erblindung des betroffenen Auges (GILGER und MICHAU, 2004). Bei der schleichenden ERU fällt die Erkrankung oft erst bei der Erscheinung eines Katarakts oder einer Beeinträchtigung des Sehens auf, da die betroffenen Pferde an einer permanenten Entzündung leiden, wenn auch in geringerer Stärke (GILGER und MICHAU, 2004). Daher wird auch diskutiert, ob diese Form weiterhin zur ERU gezählt werden soll, da diese Tiere keine klassischen Uveitis-Schübe mit darauffolgenden Ruhephasen haben (WOLLANKE et al., 2022). Die schleichende Uveitis betrifft zuerst die posterioren Augenanteile und wandert im weiteren Verlauf zu den anterioren Anteilen, bis schließlich das ganze Auge betroffen ist (MCMULLEN und FISCHER, 2017). Diese Form tritt meist bei Appaloosas, Knabstrupper und Kaltblutrassen auf (GILGER, 2010; KINGSLEY et al., 2023). Bei Knabstruppern und Appaloosas tritt die schleichende ERU zudem meist bilateral auf und führt oft zur Erblindung (KINGSLEY et al., 2023). Eine vitreale Trübung und Degeneration der Retina treten bei der posterioren Form der ERU auf (GILGER, 2010). Dem Namen entsprechend ist das Entzündungsgeschehen eher auf die hinteren Augenbestandteile beschränkt (GILGER, 2010). Es treten dabei schwere Uveitisschübe auf, die eine langsame Reaktion auf eine medikamentöse Therapie zeigen (MCMULLEN und FISCHER, 2017).

2.3.2 Ätiologie, Pathogenese und Therapie der ERU

Obwohl nachgewiesen werden konnte, dass die ERU eine immunmedierte Erkrankung ist, konnte die genaue Ätiologie der ERU immer noch nicht entschlüsselt werden (SOTH et al., 2024). Eine zentrale Rolle in der Pathogenese der ERU spielen die T-Zellen, da die ERU eine T-zell-vermittelte Erkrankung ist (DEGROOTE und DEEG, 2020). Im Auge von an ERU erkrankten Pferden wurden vorwiegend CD4+ T-Zellen gefunden, die sich gegen die retinalen Antigene Interphotorezeptor Retinoid-bindendes Protein (IRBP) und S-Antigen richten (DEEG et al., 2001). Beim Pferd konnte eine ERU-ähnliche Uveitis durch die Injektion von IRBP in Freund's Adjuvant induziert werden (DEEG et al., 2002b). Dagegen wurde bei einer Immunisierung von Pferden mit dem S-Antigen keine zuverlässige Ausprägung einer Uveitis erreicht und wurde daher als schwaches Autoantigen in Pferden eingestuft (DEEG et al., 2004). Dennoch wurde die Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen bei den mit S-Antigen immunisierten Pferden beobachtet (DEEG et al., 2002b). Später konnte über die Analyse von ERU-Autoantikörpern ein weiteres Autoantigen identifiziert werden (DEEG et al., 2006). Das zelluläre Retinaldehyd-bindendes Protein (cRALBP) induzierte in an ERU erkrankten Pferden eine Autoreaktivität der T-Zellen und sowohl beim Pferd als auch in der Maus konnte durch eine Immunisierung mit cRALBP eine Uveitis ausgelöst werden (DEEG et al., 2006). Hinweise darauf, wie es autoreaktiven Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferd gelingt die Blut-Retina-Schranke zu überwinden, konnten bereits in Zellmigrationsversuchen erlangt werden (WIEDEMANN et al., 2020). Dabei wurde festgestellt, dass Lymphozyten von an ERU erkrankten Pferden sich weitaus schneller und gerichteter als PBMCs aus gesunden Pferden auf Lockstoffe zubewegen und zudem stark von bestimmten Stoffen wie dem Autoantigen cRALBP angezogen werden (WIEDEMANN et al., 2020). Die Blut-Retina-Schranke wird beim Pferd durch das retinale Pigmentepithel gebildet (UHL et al., 2015). In an ERU erkrankten Pferden ist diese Blut-Retina-Schranke dysfunktional und ermöglicht das Eindringen von autoreaktiven Immunzellen aus der Peripherie in das Auge (UHL et al., 2014; DEGROOTE und DEEG, 2020). Eine Proteomanalyse des retinalen Pigmentepithels von gesunden und an ERU erkrankten Pferden zeigte Veränderungen im Membranproteom (UHL et al., 2014). Von Interesse war dabei das in ERU geringere abundante Protein Peripherin 2, was im retinalen Epithel von an ERU erkrankten Pferden die Integrität der retinalen Epithelzellen und damit deren Zell-Zell-

Verbindungen beeinträchtigt, wodurch die Blut-Retina-Schranke durchlässig werden könnte (UHL et al., 2015). Die Pathogenese der ERU ist durch autoreaktive T-Zellen geprägt, doch die Ätiologie der ERU bleibt weiterhin unklar (SOTH et al., 2024). Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass Granulozyten eine wichtige Rolle spielen, da sie typischerweise die ersten Immunzellen vor Ort eines entzündlichen Geschehens sind und ihre Infiltration ins Auge bei der ERU bereits nachgewiesen werden konnte (DEGROOTE und DEEG, 2020).

Die Therapie von ERU basiert zu großen Teilen auf einer Immunsuppression (MCMULLEN und FISCHER, 2017; GILGER et al., 2022). Im Falle eines akuten Schubs wird zuerst die akute Entzündung mit Entzündungshemmern behandelt und das betroffene Auge mit einem Mydriatikum weitgestellt (GILGER und MICHAU, 2004; SPIESS, 2010). Eine länger anhaltende lokale Immunsuppression kann über eine suprachoroidale Injektion von Triamcinolon (GAGNON et al., 2021) oder die chirurgische Implantation von Ciclosporin A bewirkt werden (GILGER, 2010; PADJASEK et al., 2022). Ciclosporin A wirkt dabei hemmend auf die T-Zellen (PADJASEK et al., 2022). Ein Implantat kann bis zu 38 Monate wirken (PADJASEK et al., 2022). Dadurch konnte bei 78,8% der Pferde mit einem suprachoroidalen Ciclosporinimplantat die Sehkraft des an ERU erkrankten Auges über durchschnittlich 27 Monate erhalten werden (GILGER et al., 2010). Daneben werden teilweise auch antibiotische Behandlungen, wie die intravitreale Injektion von einer geringen Dosis Gentamicin, durchgeführt (FISCHER et al., 2019; LAUNOIS et al., 2019). Allerdings zeigten hier neuere Untersuchungen, dass lediglich bei 41% der Pferde ein positiver Effekt erzielt werden konnte, der durch eine Milderung oder das Verschwinden von Uveitissymptomen definiert wurde, und 22% eine Degeneration der Retina entwickelten (MOREN et al., 2025). Ab 14 bis zu 161 Tage nach der Injektion von Gentamicin traten dabei Veränderungen im Fundusbereich, wie eine diffuse Hyperreflektivität des *Tapetum lucidum* auf, die während einer indirekten Ophthalmoskopie festgestellt wurden (MOREN et al., 2025). Es konnte abschließend allerdings nicht geklärt werden, welche Ursachen dieser Neurodegeneration zugrunde lagen (MOREN et al., 2025). Es wurde jedoch diskutiert, ob dies auf die neurotoxische Wirkung von Gentamicin auf okuläre Strukturen zurückzuführen ist (MCDONALD et al., 1986; MOREN et al., 2025).

Ein sehr neuer Ansatz in der Therapie der ERU ist die Behandlung mit einem

„suppressors of cytokine signaling 1“ (SOCS1) Mimetikum, welches die SOCS „kinase inhibitory region“ (SOCS-KIR), einen Inhibitor des JAC/STAT-Signalwegs, imitiert (STAFFORD et al., 2024). In einem murinen EAU-Modell wurde ab dem Tag der Uveitis-Induktion durch IRBP, über 13 Tage SOCS1-KIR täglich als Augentropfen verabreicht und währenddessen die Entwicklung der Uveitis dokumentiert (HE et al., 2015). Die mit SOCS1-KIR behandelten Mäusen zeigten keine Entzündungsreaktion des Auges, sowie eine signifikant verminderte Infiltration von Immunzellen in das Auge (HE et al., 2015). In einer Studie von 2022 konnte von derselben Forschungsgruppe bereits gezeigt werden, dass SOCS-KIR bei topischer Anwendung auf dem Auge und bei intrevitrealer Injektion nach 14 Tagen nicht zu okulären Schäden beim gesunden Pferd führte (PLUMMER et al., 2022). Die topische Anwendung von SOCS-KIR bei an ERU erkrankten Pferden hatte bereits nach drei Tagen zu einer deutlichen klinischen Verbesserung (signifikant reduzierte Schmerzen, geringere Kammerwassertrübung und Hyperämie) geführt (PLUMMER et al., 2022). Da SOCS-KIR eine Reduktion von ERU-assoziierten Symptomen bewirkte, wurde die weiterführende Untersuchung dieses Peptides in einer klinischen Studie vorgeschlagen (STAFFORD et al., 2024). Neben diesen konservativen Therapiemethoden ist die Pars-Plana-Vitrektomie eine chirurgische Option zur Behandlung der ERU (WERRY und GERHARDS, 1992). Hierbei wird durch eine Inzision ein Vitrektom in das Auge eingeführt, um den Glaskörper durch Spülung zu entfernen und mit einer isotonischen Lösung zu ersetzen (GILGER und MICHAU, 2004). In unbehandelten oder sehr schwerwiegenden Fällen ist es oft notwendig, eine Eukleation des betroffenen Auges vorzunehmen, wenn die Entzündung nicht mehr medikamentös behandelt werden kann oder Komplikationen wie ein Glaukom auftreten (MALALANA et al., 2020; MOREN et al., 2024). Pferde, die aufgrund von ERU, einer anderen Erkrankung oder Trauma beidseitig erblinden, müssen in vielen Fällen euthanasiert werden, da sie für sich selbst und ihre Umgebung eine Gefahr darstellen (DWYER, 2022) Beidseitig blinde Pferde können unter bestimmten Bedingungen weiterhin gehalten werden, allerdings erfordert das ein sehr hohes Maß an Besitzercompliance (DWYER, 2022).

2.3.3 Die ERU als spontanes Tiermodell für die autoimmune Uveitis des Menschen

Die autoimmune Uveitis (AU) des Menschen gehört in den USA zu den häufigsten Ursachen für Erblindung (ACHARYA et al., 2013). Ähnlich wie bei ERU existiert bislang keine Therapie, die eine vollständige Heilung ermöglicht. Maßgeblich für das heutige Verständnis der Pathogenese der AU waren wegweisende Arbeiten der experimentellen autoimmunen Uveitis (EAU) in Nagern. Bereits 1985 konnte eine EAU in der Lewis-Ratte durch adoptiven Transfer induziert werden (MOCHIZUKI et al., 1985). Hierbei wurden Ratten mit bovinem S-Antigen in Freund'schem Adjuvans immunisiert (MOCHIZUKI et al., 1985). Nach 12–14 Tagen wurden die Lymphknoten der immunisierten Tiere entnommen, kultiviert und die gewonnenen Zellen in andere Ratten übertragen, wodurch eine EAU ausgelöst werden konnte (MOCHIZUKI et al., 1985). Auffällig war dabei, dass in den Augen der erkrankten Tiere überwiegend Neutrophile nachgewiesen wurden, die somit als aktive Mitspieler in der okulären Entzündung betrachtet wurden (MOCHIZUKI et al., 1985). Darauf aufbauend konnten S-Antigen-spezifische T-Zellen aus immunisierten Lewis-Ratten isoliert werden, die bereits nach intravitrealer Injektion von nur 1×10^6 Zellen in gesunden Empfängertieren eine EAU hervorriefen (CASPI et al., 1986). Im weiteren Verlauf der Forschung wurde gezeigt, dass vor allem T-Zellen das Auge infiltrieren, jedoch auch Neutrophile erneut wesentlich beteiligt sind (CHAN et al., 1988; KIM et al., 1988). Eine alternative Methode zur EAU-Induktion besteht in der Immunisierung mit IRBP in Freund'schem Adjuvans, die sowohl in der Maus als auch beim Pferd erfolgreich etabliert werden konnte (CASPI et al., 1988; DEEG et al., 2002b). Dabei konnten in einem murinen Modell der IRBP-induzierten EAU wiederholt neutrophile Infiltrate, neben weiteren Immunzellpopulationen, in den uveitischen Augen nachgewiesen werden, die insbesondere in der Frühphase der Erkrankung ausgeprägt waren (KERR et al., 2008). In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, dass EAU in CCR2-Knockout-Mäusen durch eine von Neutrophilen dominierte Entzündung geprägt war, da Makrophagen aufgrund des Knockouts nicht ins Auge einwandern konnten (SONODA et al., 2011). Diese Ergebnisse verdeutlichen klar, dass neben T-Zellen auch Neutrophile eine zentrale Rolle in der Pathogenese der EAU einnehmen.

Auch wenn diese Modelle stetig verbessert werden, haben sie ihre Grenzen, da sie nicht den rezidivierenden Charakter der AU wiedergeben können (MESTAS und

HUGHES, 2004; CASPI et al., 2008). Da bisher kein Mausmodell entwickelt werden konnte, dass nach Induktion einen rezidivierenden Charakter zeigt (GILGER und MICHAU, 2004; YANG et al., 2022), ist die ERU das einzige spontan auftretende Modell einer autoimmunen Uveitis (DEEG et al., 2008), welches sowohl in der klinischen Erscheinung als auch in immunpathologischen Aspekten mit der AU vergleichbar ist (DEEG et al., 2008). Beim Pferd ist eine autoimmune Uveitis ebenfalls mit IRBP induzierbar während das S-Antigen zwar autoreaktive B- und T-Zellen aktiviert, aber keine Uveitis hervorruft (DEEG et al., 2002b; DEEG et al., 2004). Zudem wurde bei Pferd das cRALBP als an der ERU beteiligtes Autoantigen gefunden, dass auch in der humanen Uveitis als Autoantigen identifiziert werden konnte (DEEG et al., 2007a) (siehe 2.2.4). Insgesamt zeigen sich auch auf zellulärer Ebene einige Parallelen in den bisher bekannten Aspekten der ERU des Pferdes und AU des Menschen (MALALANA et al., 2015). Mit Blick auf das Immunsystem ist hervorzuheben, dass Menschen und Pferde ein granulozytäres Blutbild besitzen, während Nagetiere einen höheren Lymphozytenanteil als Pferde und Menschen haben (MESTAS und HUGHES, 2004; FINGERHUT et al., 2022; AWASTHI und SARODE, 2024). Inzwischen ist bekannt, dass das humane und das equine Immunsystem zahlreiche Gemeinsamkeiten teilen. Beispielsweise ähneln sich equine und humane Makrophagen stark (KARAGIANNI et al., 2021). Außerdem ist auch der equine Toll-like Rezeptor 9 eng mit dem humanen Gegenstück verwandt und wird auf denselben Leukozyten exprimiert (ZHANG et al., 2008). Fortschritte in der Methodik, wie dem Single-Cell-RNA-Sequencing, erlauben es zudem equine PBMCs näher zu charakterisieren und mit humanen PBMCs vergleichen zu können (PATEL et al., 2021). Daher ist das Pferd nicht nur in der Uveitisforschung ein wertvolles Tiermodell, sondern auch in anderen entzündlichen Erkrankungen (LARSON und WAGNER, 2021). Ein weiterer Aspekt, der Pferde mit Menschen vergleichbar macht, ist ihre lange Lebensspanne gegenüber von Nagern. Diese erlaubt es den Verlauf von Krankheiten wie der ERU über Jahre zu dokumentieren (MALALANA et al., 2023). Zudem erfährt das Immunsystem des Pferdes vergleichbare altersabhängige Veränderungen wie der Mensch (DENOTTA und MCFARLANE, 2023). Darunter fallen unter anderem eine reduzierte Lymphozytenproliferation und Antikörperbildung (DENOTTA und MCFARLANE, 2023). Auch in ihrer Lebensweise haben Pferde mehr Ähnlichkeiten mit Menschen als Mäuse, die meist unter sterilen Laborbedingungen leben (PATEL et al.,

2021). Zudem sind Pferde, wie Menschen, tagaktiv, im Gegensatz zu den nachtaktiven Nagetieren (KARAGIANNI et al., 2021). Neben den biologischen Parallelen spricht auch die tierschutzrelevante Perspektive für das Pferd als Modellorganismus. Blutentnahmen zur Gewinnung peripherer Immunzellen erfolgen in der Regel ohne nennenswerte Schäden und aufgrund der Körpergröße können beim Pferd bis zu 20 ml/kg Blut gewonnen werden (MALIKIDES et al., 2001). Dagegen ist eine Blutentnahme von größeren Mengen Blut bei der Maus oft mit der Euthanasie der Tiere verbunden (BOWERS et al., 2025; LI et al., 2025c). Auch Glaskörperflüssigkeit oder ganze Augen können beim Pferd im Rahmen einer Behandlung (Pars-Plana-Vitrektomie, E nukleation) oder bei der Schlachtung gewonnen werden, wodurch eine Zucht von Versuchstieren entfallen könnte (SWADZBA et al., 2012).

2.3.4 Die Rolle des neutrophilen Granulozyten in der ERU

Obwohl die ERU als T-zell-vermittelte Erkrankung angesehen wird, weisen einige Studien darauf hin, dass auch neutrophile Granulozyten eine zentrale Funktion in der Pathogenese haben (WEIGAND et al., 2021; DEGROOTE et al., 2023). Granulozyten sind die ersten Immunzellen, die bei einer Entzündungsreaktion eintreffen und durch ihr Wirken können sie die Entzündungsreaktion steuern, was ihre bedeutende Rolle hervorhebt (HERRERO-CERVERA et al., 2022). Wie wichtig Neutrophile in der autoimmunen Uveitis sind, konnte in einem murinen EAU-Modell gezeigt werden (GOLDBERG et al., 2016). G-CSF defiziente Mäuse oder Mäuse, die mit einem Anti-G-CSF-Antikörper behandelt wurden, zeigten in histologischen Schnitten der EAU-Augen geringere Schäden sowie eine signifikant geringere Anzahl an infiltrierenden Neutrophilen (GOLDBERG et al., 2016). Auch wenn diese Ergebnisse bisher nicht auf das Pferd übertragen werden konnten, spricht dies dafür, dass auch bei der ERU die Neutrophilen einen großen Anteil an der Pathogenese haben.

Unsere Forschungsgruppe konnte schon 2001 nachweisen, dass neben den vorwiegend auftretenden Lymphozyten auch Neutrophile die Blut-Retina-Schranke überwinden und das Auge bei der ERU infiltrieren (DEEG et al., 2001). Bei einigen an ERU erkrankten Pferden stellten die Neutrophilen im Auge sogar den mengenmäßig größten Anteil der infiltrierten Immunzellen dar (DEEG et al., 2001). In das Auge infiltrierende Neutrophile zeigten eine stark verringerte Abundanz von Talin 1, ein

wichtiger Integrinregulator in Leukozyten (DEGROOTE et al., 2013). Diese geringe Abundanz von Talin 1, sowie die seines Interaktionspartners CD90, konnte auch in peripher zirkulierenden Neutrophilen aus an ERU erkrankten Pferden festgestellt werden (DEGROOTE et al., 2013). Desweiteren wurde erkannt, dass mit IL8 stimulierte Neutrophile von an ERU erkrankten Pferden generell mit einer erhöhten Zellmotilität und -migration assoziiert sind, da Stoffwechselwege wie die Leukozytenextravasation aktiviert waren (HOFFMANN et al., 2022). Eine differenzielle Proteomanalyse von Granulozyten aus dem peripheren Blut von gesunden und an ERU erkrankten Pferden ergab, dass sich das Proteom von ERU-Granulozyten von dem gesunden Granulozyten signifikant unterscheidet (WEIGAND et al., 2021). Dabei hatten Proteine, die zu den Stoffwechselwegen „RAF/MAP kinase signaling“, MHC-I Antigen Präsentation und der neutrophile Degranulation beitragen, eine erhöhte Abundanz (WEIGAND et al., 2021). Von besonderem Interesse war dabei die neutrophile Degranulation, da bereits eine vorherige Studie, die das Proteom von gesunden equinen Neutrophilen untersucht hat, gezeigt hat, dass die neutrophile Degranulation auch durch Stimulation mit PMA oder IL8 induziert wurde (DEGROOTE et al., 2019). Ebenso konnte das auch in PMA stimulierten Neutrophilen von an ERU erkrankten Pferden gezeigt werden (DEGROOTE et al., 2023). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Neutrophile von an ERU erkrankten Pferden stets in einer Art präaktivem Zustand sind, sogar in der Ruhephase zwischen zwei akuten Uveitis-Schüben (WEIGAND et al., 2021). Es ist festzuhalten, dass Neutrophile aus an ERU erkrankten Pferden eine sehr spezifische und auch sehr heterogene Funktion zeigen, die durch die aktivierten Stoffwechselwege zum Ausdruck gebracht werden (DEGROOTE et al., 2023). Als immunmodulatorische Funktionen der Neutrophilen wurde neben der neutrophilen Degranulation auch eine erhöhte Produktion von NETs von an ERU erkrankten Pferden festgestellt (siehe 2.3.2.) (FINGERHUT et al., 2019). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass NETs cytotoxisch auf humane retinale Epithelzellen wirken und da diese Zellen die Blut-Retina-Schranke bilden, beeinträchtigen sie auch deren Funktion (FINGERHUT et al., 2022). Da die Beeinträchtigung der Blut-Retina-Schranke ein initiales Ereignis in der Pathogenese der ERU ist, könnte diese weitere Aufschlüsse über die Funktion der Neutrophilen in der ERU geben (FINGERHUT et al., 2022).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Probenmaterial

Für diese Arbeit wurden neutrophile Granulozyten aus den Blutproben von insgesamt 13 gesunden und 22 an ERU erkrankten Pferden analysiert. Von einem gesunden Pferd wurden dreimal Blutproben entnommen und für drei unterschiedliche Versuche verwendet. Von zwei gesunden Pferden wurden zweimal Blutproben für zwei unterschiedliche Versuche verwendet. Alle anderen Tiere wurden nur einmal beprobt und deren Blutproben wurden nur für einen Versuch verwendet.

Alle gesunden Pferde waren zum Zeitpunkt der Beprobung klinisch ohne besonderen Befund. Zudem waren bei diesen Pferden keine entzündlichen Veränderungen der Augen in der Vergangenheit bekannt. Die Blutentnahmen der Kontrolltiere wurde bei der Regierung von Oberbayern genehmigt und angezeigt mit der Genehmigungsnummer ROB-55.2-2532.Vet_03-22-37.

Das Klinikpersonal der Pferdeklinik der LMU München führte die Blutentnahme der an ERU erkrankten Pferde vor einem operativen Eingriff über einen Jugularvenenkatheter durch. Eine vorliegende ERU wurde von Tierärzten mit fundierten Kenntnissen in der Augenheilkunde diagnostiziert. Dafür wurde der Vorbericht sowie klinische Symptome (siehe 2.3.2) miteinbezogen. Dabei wurde eine Blutprobe von einem an ERU erkrankten Pferd für zwei unterschiedliche Versuche verwendet. Alle anderen Proben wurden für einen Versuch verwendet.

Folgende Anzahl an Pferden wurde jeweils für die einzelnen Experimente verwendet:

Charakterisierung der Oberflächenglykosylierung durch Pflanzenlektin-Assay mittels Durchflusszytometrie:

- Neutrophile von 5-7 gesunden Pferden pro Pflanzenlektin
- Neutrophile von 9-11 an ERU erkrankten Pferden pro Pflanzenlektin

Quantifizierung der Bindung von DBA, JAC und BanLec an equine Neutrophile mittels Immunzytochemie:

- Neutrophile von 3 gesunden Pferden
- Neutrophile von 3 an ERU erkrankten Pferden

Untersuchung der Bindung von JAC und ITGB2 an equine Neutrophile mittels Immunzytochemie:

- Neutrophile von 1 gesunden Pferd
- Neutrophile von 2 an ERU erkrankten Pferden

Untersuchung von JAC-Präzipitaten aus lysierten Neutrophilen mittels Pflanzenlektinpräzipitation:

- Neutrophile von 3 gesunden Pferden
- Neutrophile von 3 an ERU erkrankten Pferden

Untersuchung der Zuckerinhibition der JAC-Bindung an equine Neutrophile mittels Durchflusszytometrie

- Neutrophile von 7 Pferden

3.2 Isolierung von Neutrophilen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

3.2.1 Puffer und Lösungen

Heparin-Lösung zur Gerinnungshemmung (2500 I.E./ml)

Heparin-Natrium¹ (25.000 I.E./ml) 1,00 ml

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640

Medium mit Glutamin² 9,00 ml

Trennlösung zur Isolierung von PBMC mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

Pancoll-Trennlösung (Dichte 1,077 g/ml)³, gebrauchsfertig

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4

NaCl⁴ (136,9 mM) 8,00 g

KH₂HPO₄⁵ (1,4 mM) 0,20 g

KCL⁶ (2,6 mM) 0,20 g

Na₂HPO₄ x 2H₂O⁴ (8 mM) 1,45 g

in 1000 ml Aqua dest. lösen, pH auf 7,4 einstellen.

¹ Ratiopharm, Ulm

² PanBiotech, Aidenbach

³ Panbiotech, Aidenbach

⁴ Carl Roth, Karlsruhe

⁵ Merck, Darmstadt

⁶ Carl Roth, Karlsruhe

3.2.2 Gewinnung von Blutproben

Die Blutproben der Pferde wurden durch die Punktion der Vena jugularis dexter oder sinister im jeweils oberen Drittel des Halses gewonnen. Die Punktionsstelle wurde vor der Entnahme sorgfältig desinfiziert und während des ganzen Vorgangs wurde die Vene mit einem Finger angestaut, um sie sichtbar zu machen und den Blutfluss zu erhöhen. Es wurden jeweils 50 ml Vollblut abgenommen und mit 1 ml Heparin-Lösung (2.500 I.E./ml) gemischt.

3.2.3 Isolierung von Neutrophilen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

Die Blutproben wurden bei Raumtemperatur (RT) aufrecht gelagert, bis sich die Erythrozyten nach wenigen Minuten unten abgesetzt haben. Anschließend wurde das leukozytenreiche Plasma abgenommen und jeweils 5 ml davon vorsichtig auf jeweils 3 ml Pancoll-Trennlösung² in einem 15 ml Röhrchen⁵ gegeben. Im Anschluss wurden die Röhrchen bei RT für 25 min bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (*engl.* relative centrifugal force, rcf) von 350 und schwacher Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation ist eine weiße Interphase zwischen der Plasma- und Pancoll-Schicht erkennbar, die vorwiegend aus PBMCs besteht. Darunter befindet sich eine rote Schicht, die sedimentierte Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten enthält. Plasmaschicht, Interphase und Pancoll-Schicht wurden bis knapp über die rote sedimentierte Schicht abgenommen und verworfen. Die verbliebene Schicht wurde mit 1 ml PBS resuspendiert und anschließend in einem 50 ml Röhrchen gesammelt. Daraufhin wurden die Erythrozyten lysiert, indem 20 ml NaCl 0,2% hinzugefügt wurden und das verschlossene Röhrchen für 30 s geschwenkt wurde. Sofort danach wurden 20 ml NaCl 1,6% hinzugegeben, damit der Inhalt des Röhrchens wieder isotonisch wird. Daraufhin wurden die neutrophilen Granulozyten gewaschen (400 rcf, RT, Bremse an) und anschließend nochmals lysiert und gewaschen, um möglichst viele Erythrozyten zu entfernen. Die neutrophilen Granulozyten wurden nach dem letzten Waschschrift in PBS resuspendiert.

3.2.4 Ermittlung der Zellzahl

Die Zellzahl der Neutrophilen wurde über eine Neubauer-improved Zählkammer⁷ mit einer Kammertiefe von 0,1 mm bestimmt. Zur Exklusion von toten Zellen wurden 10 µl der Zellsuspension und 10 µl Trypanblau⁸ miteinander vermengt. Von diesem Gemisch wurden 10 µl in die Zählkammer gegeben und anschließend wurden zwei oder vier große Eckquadrate aber mindestens 100 Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Dafür wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Zellen pro } \mu\text{l Suspension} = \frac{\text{gezählte Zellzahl}}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadrate} \times \text{Kammertiefe [mm]} \times \text{Verdünnung}}$$

3.3 Durchflusszytometrie zur Ermittlung der Oberflächen-glykosylierung mittels Pflanzenlektinen

3.3.1 Puffer und Lösungen

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4

Siehe Kapitel 3.2.1

Paraformaldehyd-Lösung (1%) (PFA)

Paraformaldehyd⁹ 4 g

Unter Erhitzung auf bis zu 70°C in 100 ml PBS lösen, pH auf 7,4 einstellen. Für 1%ige Lösung 1:3 mit PBS mischen.

⁷ NeoLab, Heidelberg

⁸ VWR, Darmstadt

⁹ Merck, Darmstadt

3.3.2 Lebend-Tot-Färbung

Zum Ausschluss von toten Zellen wurde eine Lebend-Tot-Färbung mit Viobility 400/452 Fixable Dye¹⁰ durchgeführt. Dabei wurden je 10⁷ Zellen mit 1 µl Viobility 400/452 Fixable Dye und 100 µl PBS vermischt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in PBS resuspendiert.

3.3.3 Pflanzenlektine und fluoreszierende Liganden

Die verwendeten Pflanzenlektine und fluoreszierende Liganden sind in den folgenden Tabellen aufgeführt:

Pflanzenlektin	Firma	Markierung	Eingesetzte Konzentration
Aleuria Aurantia Lectin (AAL)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Agaricus Bisporus Lectin (ABL)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Amaranthus Caudatus Lectin (ACL)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Bananen Lectin (BanLec)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Bauhinia Purpurea Lectin (BPL)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Concanavalin A (ConA)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Dolichos Biflorus Agglutinin (DBA)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Datura Stramonium Lectin (DSL)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Erythrina Cristagalli Lectin (ECL)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Galanthus Nivalis Lectin (GNL)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml

¹⁰ Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

MATERIAL UND METHODEN

Griffonia Simplicifolia Lectin I (GSL-I)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Griffonia Simplicifolia Lectin I Isolectin B4 (GSL-I-B4)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Griffonia Simplicifolia Lectin II (GSL-II)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Hippeastrum Hybrid Lectin (HHL)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Jacalin (JAC)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Lens Culinaris Agglutinin (LCA)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Lycopersicon Esculentum Lectin (LEL)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Lotus Tetragonolobus Lectin (LTL)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Maackia Amurensis Lectin II (MAL-II)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Narcissus Pseudonarcissus Lectin (NPL)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Phaseolus Vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Phaseolus Vulgaris Leucoagglutinin (PHA-L)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Peanut Agglutinin (PNA)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Pisum Sativum Agglutinin (PSA)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Psophocarpus Tetragonolobus Lectin	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml

MATERIAL UND METHODEN

(PTL)			
Ricinus Communis Agglutinin I (RCA-I)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Soybean Agglutinin (SBA)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Sophora Japonica Agglutinin (SJA)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Sambucus Nigra Lectin (SNA)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Solanum Tuberosum Lectin (STL)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Succinylated Wheat Germ Agglutinin (SWGGA)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Ulex Europaeus Agglutinin I (UEA-1)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Vicia Villosa Lectin (VVA)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Wisteria Floribunda Lectin (WFL)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
Wheat Germ Agglutinin (WGA)	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml

Fluoreszierender Ligand	Firma	Markierung	Verdünnung
Streptavidin iFluor 488	Biomol, Hamburg	Fluor 488	1:200
Streptavidin iFluor 555	Biomol, Hamburg	Fluor 555	1:200

3.3.4 Färbung

Die Lebend-Tot-gefärbten Neutrophilen (siehe 3.3.3), wurden mit einer Zellzahl von 5×10^5 Zellen pro Delle in eine 96-Loch-Platte mit U-Boden ausgesät, anschließend bei 400 rcf für 2 min bei RT abzentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Dann wurde jeweils 30 μ l jeden Pflanzenlektins in einer Konzentration von 1 μ g/ml in PBS je eine Delle gegeben wurden und nach sorgfältigem resuspendieren wurden die Zellen bei RT 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Dellen mit 170 μ l PBS resuspendiert, bei 400 rcf für 2 min bei RT gewaschen und der resultierende Überstand dekantiert. Der an die Neutrophilen gebundene Biotin-Pflanzenlektin-Komplex wurde mit je 30 μ l Streptavidinlösung 488 oder 555 für Inkubationszeit von 15 min bei RT fluoreszenzmarkiert und nach Ablauf dieser Zeitspanne wurden die Zellen erneut mit 170 μ l PBS resuspendiert, bei 400 rcf für 2 min bei RT gewaschen und der Überstand anschließend dekantiert. Zuletzt wurden die markierten und gefärbten Zellen mit 200 μ l PFA 1% fixiert und mittels Durchflusszytometrie gemessen, um die Bindungseigenschaften von Pflanzenlektinen über die Fluoreszenzmarkierung analysieren zu können.

3.3.5 Detektion mittels Durchflusszytometer

Die Messungen wurde mit dem Durchflusszytometer NovoCyte Quanteon 4016¹¹ durchgeführt, welches mit vier verschiedenen Lasern und 16 Fluoreszenzkanälen fluoreszenz-markierte Strukturen auf der Zelle darstellen kann. Die genutzten fluoreszierenden Liganden werden von verschiedenen Lasern zur Emission angeregt: die Exzitation von Streptavidin iFluor 488 erfolgt mit einem Laser der Wellenlänge 488 nm und Streptavidin iFluor 555 wird mit dem 561 nm Laser angeregt. Die bei der Emission freigesetzten Photonen werden von hochempfindlichen Avalanche-Photodioden über passende Filter detektiert, elektronisch verstärkt und in digitale Daten umgewandelt. Die graphische Darstellung dieser Daten erfolgt als Punktwolke (Dotplot), in der jeder Punkt ein vom Gerät registriertes Ereignis (z.B. eine Zelle) repräsentiert, oder als Histogramm. Durch die Lebend-Tot-Färbung (Exzitation über

¹¹ Agilent Technologies, Waldbronn

405 nm Laser) wurden tote Zellen von der Analyse ausgeschlossen. Es wurden mindestens 5000 Zellen pro Delle analysiert.

3.3.6 Auswertung und Statistik

Die Auswertung der Durchflusszytometrie wurden mit der Flowlogic Software¹² V7 durchgeführt. Im Histogramm wurden zuerst durch den Kanal Pacific-Blue-A V-445-A alle toten Zellen exkludiert. Da tote Zellen unspezifische Bindungen eingehen und dadurch die Signalintegrität beeinträchtigen können, erfolgte zunächst der Ausschluss der toten Zellen, die durch Anfärbung mit Viobility 400/452 Fixable Dye identifiziert wurden. Anschließend wurde der Ausschluss von Dubletten durchgeführt. Hierfür wurden die zwei Signalparameter der Vorwärtsstreuung (Forward-Scatter, FSC) miteinander verglichen: Höhe (FSC-H) und Fläche (FSC-A). So wurden nur Ereignisse mit charakteristischen Eigenschaften einzelner Zellen berücksichtigt. Dadurch wurden ausschließlich intakte, einzelne und lebende Zellen in die Auswertung einbezogen. Anschließend wurde Bindungsstärke der Pflanzenlektine analysiert. Dazu wurden die gemessenen und bereinigten Daten als Histogramm dargestellt, mit der Fluoreszenzstärke auf der X-Achse und der Zellzahl auf der Y-Achse. Die Position des Histogramms auf der X-Achse ergab die mittlere Fluoreszenzintensität (*engl.* mean fluorescence intensity, MFI) für das jeweils untersuchte Pflanzenlektin. Diese wurde anschließend mit folgender Formel normalisiert:

$$\text{normalisierte MFI} = \frac{\text{MFI Pflanzenlektinfärbung}}{\text{MFI ohne Pflanzenlektinfärbung}}$$

Zur statistischen Auswertung der durchflusszytometrischen Untersuchung, wurden die normalisierten MFI-Werte der Pflanzenlektinfärbung je Gruppe (gesund / ERU) und Pflanzenlektin auf ihre Normalverteilung mittels des Kolmogorov-Smirnov Tests (KS) untersucht. Der Grubb's Test wurde bei allen Gruppen angewendet, in denen

¹² Inivai Technologies, Mentone Victoria, Australien

Ausreißer vermutet wurden aufgrund ihrer hohen Abweichung von Kontroll- und ERU-Werten. Der Grubb's Test ist nur bei Werten durchgeführt worden, die ohne den ermittelten Ausreißer der Normalverteilung entsprachen. Bei Daten, die einer Normalverteilung entsprachen ($KS\ p > 0,05$), wurden statistische Unterschiede zwischen den zwei Gruppen mit dem Student's t-Test bewertet. Die Gleichheit der Varianzen wurde mit dem F-Test ($p > 0,05$) geprüft. Bei signifikant unterschiedlichen Varianzen oder ungleichen Gruppengrößen wurde zusätzlich die Welch's Korrektur des Student's t-Test angewendet. Für Daten, die keiner Normalverteilung folgten, wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die statistische Signifikanz wurde wie folgt angegeben: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$. Die statistischen Analysen und deren graphische Darstellung wurden mit der GraphPad Prism Software Version 5.04¹³ durchgeführt.

3.4 Immunzytochemie

3.4.1 Puffer und Lösungen

PBS, pH 7,4

Siehe Kapitel 3.3.1

PFA (1%)

Siehe Kapitel 3.3.1

3.4.2 Pflanzenlektine, Antikörper und fluoreszierende Liganden

Die verwendeten Pflanzenlektine, Antikörper und die dazugehörigen fluoreszierenden Liganden sind im Folgenden aufgelistet:

¹³ GraphPad Software, San Diego, USA

MATERIAL UND METHODEN

Pflanzenlektin	Firma	Markierung	Eingesetzte Konzentration
BanLec	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
DBA	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml
JAC	Biozol, Eching	Biotin	1 µg/ml

Antikörper	Firma	Typ	Isotyp	Verdünnung
Anti-CD18	Abcam, El Rozenburg, Niederlande	monoklonal	mIgG1	1:100
Ziege-anti-Maus IgG Alexa568	Invitrogen, Karlsruhe	polyklonal	gtIgG	1:500

Fluoreszierender Ligand	Firma	Markierung	Verdünnung
Streptavidin iFluor 488	Biomol, Hamburg	Fluor 488	1:200
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen, Karlsruhe	DAPI	1:1000

3.4.3 Färbung

Die Färbung der Immunzytologischen Präparate erfolgte analog zu der Färbung für die Durchflusszytometrie (siehe 3.3.4), jedoch ohne die Lebend-Tot-Färbung. Im letzten Schritt wurde zum 1%igen PFA in PBS zusätzlich DAPI im Verhältnis 1:1000 beigemischt. Dieser weitere Färbeschritt dient der Anfärbung der Zellkerne, der die

Unterscheidung der segmentierten Zellkerne der Neutrophilen von anderen Immunzellen erleichtert.

3.4.4 Transfer der Proben auf den Objektträger, Visualisierung und Quantifizierung

Je 100 μl der gefärbten Zellsuspension (entspricht $2,5 \times 10^5$ Zellen) wurde über einen Zyto-Trichter auf den Objektträger pipettiert und anschließend mit einer Cytospin-Zentrifuge¹⁴ bei 300 rcf für 10 min bei RT zentrifugiert. Die Zellen wurden danach durch das Hinzugeben von Fluoromountmedium¹⁵ und 22 x 40 mm Deckgläsern¹⁶ eingedeckelt. Nach dem Trocknen wurden die Präparate mit dem Leica DMI8 Mikroskop¹⁷ und der LAS-X-Software¹⁸ visualisiert und beurteilt. Durch das THUNDER Computational Clearing¹⁹ wurde der Hintergrund entfernt und die aufgenommenen Bilder geschärft. Die aufgenommenen Bilder wurden via ImageJ (Version 1.54g) (SCHNEIDER et al., 2012) quantifiziert.

3.4.5 Statistische Analyse

Zur Beurteilung der Normalverteilung der quantifizierten Bilder wurde KS-Test angewendet. Entsprachen die Daten der Normalverteilung ($KS\ p > 0,05$), wurden statistische Unterschiede zwischen zwei Gruppen mit dem Student's t-Test bewertet. Mit dem F-Test ($p > 0,05$) wurde die Gleichheit der Varianzen geprüft. Bei signifikant unterschiedlichen Varianzen wurde zusätzlich die Welch's Korrektur des Student's t-Test angewendet. Die statistische Signifikanz wurde wie folgt angegeben: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$. Die statistischen Analysen und deren graphische Darstellung wurden mit der GraphPad Prism Software Version 5.04²⁰

¹⁴ Hettich, Kirchlegern

¹⁵ Serva, Heidelberg

¹⁶ VWR, Belgien

¹⁷ Leica Microsystems, Wetzlar

¹⁸ Leica Microsystems, Wetzlar

¹⁹ Leica Microsystems, Wetzlar

²⁰ GraphPad Software, San Diego, USA

durchgeführt.

3.5 Jacalin-Präzipitation

3.5.1 Puffer und Lösungen

Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS), pH 7,4

Tris (10 mM) ²¹	1,21 g
NaCl (150 mM) ²²	8,80 g

In 1000 ml destilliertem Wasser lösen und pH auf 7,4 einstellen.

3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)- Lysepuffer

TBS	9,6 ml
2% CHAPS ²³	0,2 g
4% complete Protease Inhibitor ²⁴	400 µl

CHAPS in TBS lösen, complete hinzufügen. Anschließend in 1 ml aliquotieren und bei -20°C aufbewahren.

Tris-Puffer, pH 7,5

Tris (175 mM) ²⁵	212 mg
-----------------------------	--------

In 10 ml destilliertem Wasser lösen und pH auf 7,5 einstellen.

²¹ Carl Roth, Karlsruhe

²² Carl Roth, Karlsruhe

²³ Carl Roth, Karlsruhe

²⁴ Implen, München

²⁵ Carl Roth, Karlsruhe

PBS, pH 7,4

Siehe 3.3.1

2x Laemmli-Puffer (ohne DTT und Glycerin)

1,5 M Tris-HCl ²⁶ , pH 6,8 (100 mM)	666 µl
10% SDS-Lösung (1%)	1000 µl
500 mM 2-Mercaptoethanol ²⁷	140 µl

In 8190 µl Aqua bidest. und eine Spatelspitze Bromphenolblau-Pulver hinzufügen. Anschließend in 1 ml Lösung aliquetieren und bei -20°C aufbewahren.

Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 10%

SDS ²⁸	10,0 g
-------------------	--------

In 100 ml Aqua bidest. lösen. Lösung bei RT lagern.

3.5.2 Zellyse

Die Neutrophilen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden wurden lysiert, indem jeweils 5×10^5 Zellen mit 500 µl CHAPS-Lysepuffer vermennt wurden und anschließend unter mehrmaligem Durchmischen für 30 min auf Eis inkubiert wurden. Die lysierten Zellen wurden nachfolgend in einen QIAshredder Homogenisator²⁹ gefüllt und bei 16100 rcf für 2 min bei 23°C zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt zweimal durchgeführt.

²⁶ Carl Roth, Karlsruhe

²⁷ Carl Roth, Karlsruhe

²⁸ AppliChem, Darmstadt

²⁹ Implen, München

3.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate erfolgte über den Pierce BCA Protein Assay. Dafür wurde eine Eichkurve mit bovinem Serumalbumin (BSA)³⁰ und dem CHAPS-Puffer angesetzt:

Ansatz	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Konzentration in µg/ml BSA	2000	1500	1000	750	500	250	125	25	0

Jeweils 25 µl der Ansätze wurde in jeweils eine Delle einer 96-Lochplatte pipettiert. Die Zelllysate wurden jeweils 1:25 mit dem CHAPS-Lysepuffer vermischt und daraus wurden ebenfalls 25 µl in eine Delle pipettiert. In jede Delle wurden dann 200 µl einer Lösung gegeben, die aus 50 Teilen BCA Reagenz A und einem Teil BCA Reagenz B besteht. Die Platte wurde anschließend mit Parafilm³¹ abgedichtet und inkubierte 30 min bei 37°C im Wärmeschrank. Anschließend wurde die Platte kurz auf RT abgekühlt, bevor die photometrische Bestimmung der Extinktion bei 562 nm im ELISA Reader³² erfolgte. Die Proteinkonzentration wurde anhand der aus der Verdünnungsreihe erstellten Eichgerade rechnerisch ermittelt.

3.5.4 Pflanzenlektinpräzipitation mit JAC-Agarose

Zur Präzipitation von zellulären Proteinen mit JAC, wurden 100 µl Jacalin-Agarose³³ in ein „low-binding“ Reaktionsgefäß³⁴ überführt und fünfmal mit 250 µl Tris-Puffer bei 1800 rcf für 30 s bei 23°C gewaschen. Anschließend wurde die Jacalin-Agarose mit jeweils 1 mg Zelllysate resuspendiert. Im Reaktionsgefäß wurde diese Suspension über Nacht bei 4°C rotiert. Am nächsten Tag wurden die präzipitierten Proben bei 1000 rcf für 2 min bei RT zentrifugiert und die Überstände wurden abgenommen und in neue

³⁰ Serva, Heidelberg

³¹ Carl Roth, Karlsruhe

³² Tecan, Crailsheim

³³ Biozol, Eching

³⁴ Sarstedt, Nürmbrecht

low-binding Reaktionsgefäße überführt. Die Präzipitate wurden dreimal mit je 150 µl PBS bei 1000 rcf für je 1 min gewaschen, bevor 2x Laemmlipuffer hinzugefügt wurde und die Proben auf 95°C für 10 min unter ständigem Schütteln bei 400 rcf im Thermomixer³⁵ erhitzt wurden. Zuletzt wurden die Proben nochmals bei 1000 rcf für 2 min bei RT zentrifugiert, um die Agarose von den JAC-Eluaten zu trennen. Die Eluate wurden schließlich mit einer dünnen Pipettenspitze vorsichtig abgenommen und für die Gelelektrophorese in einem „low-binding“ Reaktionsgefäß aufbewahrt.

3.5.5 SDS-Page

3.5.5.1 Puffer und Lösungen

Acrylamid-Lösung

Acrylamid-Bis Lösung 33%, gebrauchsfertig³⁶

Bromphenolblau-Lösung

Eine Spatelspitze Bromphenolblau-Pulver³⁷ in Aqua bidest. lösen.

Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung 10%

APS³⁸ (10%) 0,10 g

In 1 ml Aqua bidest lösen.

N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamine (TEMED)-Lösung

TEMED, gebrauchsfertig³⁹

³⁵ Eppendorf, Hamburg

³⁶ Serva, Heidelberg

³⁷ Sigma, Steinheim

³⁸ Serva, Heidelberg

³⁹ AppliChem, Darmstadt

SDS-Lösung 10%

Siehe Kapitel 3.5.1

Gelpuffer, pH 8,8

Tris⁴⁰ (1,5 M) 18,15 g

In 100 ml Aqua bidest. lösen und pH auf 8,8 einstellen.

Sammelgelpuffer, pH 6,8

Tris⁴¹ (0,5 M) 6,00 g

In 100 ml Aqua bidest. lösen und pH auf 6,8 einstellen.

5x Elektrophoresepuffer-Stammlösung, pH 8,3

Tris⁴² (124 mM) 15,00 g

Glycin⁴³ (960 mM) 72,00 g

SDS⁴⁴ 5,00 g

In 1000 ml Aqua dest. Lösen und pH auf 8,3 einstellen.

Die Stammlösung wird für die Elektrophorese 1:5 mit Aqua dest. verdünnt.

5x Lämmli-puffer (reduzierend)

1,5 M Tris-HCl⁴⁵, pH 6,8 (250 mM) 8,33 ml

20% SDS-Lösung (5%) 12,50 ml

⁴⁰ Carl Roth, Karlsruhe

⁴¹ Carl Roth, Karlsruhe

⁴² Carl Roth, Karlsruhe

⁴³ Carl Roth, Karlsruhe

⁴⁴ Applichem, Darmstadt

⁴⁵ Carl Roth, Karlsruhe

MATERIAL UND METHODEN

Glycerin⁴⁶, wasserfrei (50%) 25,00 ml

500 mM 2-Mercaptoethanol⁴⁷ 1,75 ml

In 50 ml Aqua bidest. und eine Spatelspitze Bromphenolblau-Pulver hinzufügen.
Lösung aliquotieren und bei -20°C lagern.

Abdichtgel

Aqua bidest. 400 µl

33% Acrylamid-Lösung 200 µl

10% APS-Lösung 20 µl

TEMED-Lösung 2 µl

APS- und TEMED-Lösung erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugeben.

Laufgel (10% SDS Gel)

Aqua bidest. 4,20 ml

Gelpuffer, pH 8,8 2,5 ml

33% Acrylamid-Lösung 3,30 ml

10% SDS-Lösung 100 µl

10% APS-Lösung 50 µl

TEMED-Lösung 20 µl

APS- und TEMED-Lösung erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele hinzufügen.

⁴⁶ Serva, Heidelberg

⁴⁷ Carl Roth, Karlsruhe

Sammelgel (4% SDS Gel)

Aqua bidest.	6,17 ml
Sammelgelpuffer, pH 6,8	2,5 ml
33% Acrylamin-Lösung	1,33 ml
10% SDS-Lösung	100 µl
Bromphenolblau-Lösung	30 µl
10% APS-Lösung	90 µl
TEMED-Lösung	30 µl

APS- und TEMED-Lösung erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele hinzufügen.

2-Propanol

2-Propanol (Isopropanol), gebrauchsfertig⁴⁸

3.5.5.2 Durchführung der 1D Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Eluate des Jacalin-Präzipitation, wurde die Methode nach Laemmli verwendet (LAEMMLI, 1970). Die Methode erlaubt es, die enthaltenen Proteine durch Anlegen einer elektrischen Spannung, nach ihrem molekularen Gewicht aufzutrennen. Gegossen wurden die Gele in einer Mini Protean Tetra System Gießkammer⁴⁹ mit einer Größe von 8 x 7 cm und einer Dicke von 1 mm. Das Auslaufen der Gele wurde verhindert, indem vorab ein schnell aushärtendes Abdichtgel eingegossen wurde. Darauf folgte das Eingießen des 10%igen Laufgels, das im noch flüssigen Zustand mit Isopropanol übergossen wurde, um eine glatte Geloberfläche zu erhalten. Das Laufgel wurde für 30 min bei RT ausgehärtet. Anschließend wurde das Isopropanol entfernt, um das Sammelgel auf das Laufgel zu schichten. Sofort wurde ein Kamm ohne Luftblasen in das noch flüssige Sammelgel eingesetzt, um Taschen

⁴⁸ CLN, Freising

⁴⁹ BioRad, Neuried

für die Proben zu formen. Die Gele wurden erneut für etwa 30 min bei RT ausgehärtet. Währenddessen wurden je 2 µl der Überstände und 5 µg/µl der Lysate mit CHAPS-Lysepuffer auf jeweils 20 µl pro Probe aufgefüllt. Je 20 µl der Eluate, Überstände und Lysate wurden je in einem Verhältnis von 5:1 mit 5x Laemmli-puffer versetzt. Die Proben wurden für fünf Minuten bei 95°C unter ständigem Schütteln bei 750 rcf im Thermomixer⁵⁰ erhitzt und nach Ablauf der Zeit abgekühlt. Der Serva Triple Color Protein Standard III⁵¹ wurde als molekularer Gewichtsmarker in der jeweils ersten Probetasche von links in einer Menge von 4 µl verwendet. Die fertigen Proben wurden jeweils auf die weiteren Probetaschen aufgeteilt. Die beladenen Gele wurden in die Elektrophoresekammern⁵² gesetzt, die daraufhin mit 1 x Elektrophoresepuffer gefüllt wurden. Die gefüllten Kammern wurden an das PowerPac Basic Supply⁵³ angeschlossen und eine Spannung von 12,5 mA pro Gel eingestellt. Nach kurzer Zeit bildete sich eine blaue Lauffront. Hat diese Lauffront das Ende des Sammelgels erreichen, wurde die Spannung auf 25 mA pro Gel erhöht. Die Gelelektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hat.

3.5.6 Sensitive Coomassiefärbung nach Kang zur Visualisierung der Proteinbanden

3.5.6.1 Puffer und Lösungen

Sensitive Coomassie-Färbelösung

5% Aluminiumsulfat ⁵⁴ (14-18 Hydrat)	50 g
10% Ethanol ⁵⁵ (99,99%)	100 ml
0,02% Coomassie Brilliant Blue G-250 ⁵⁶	0,2 g

⁵⁰ Eppendorf, Hamburg

⁵¹ Serva Electrophoresis, Heidelberg

⁵² BioRad, Neuried

⁵³ BioRad, Neuried

⁵⁴ AppliChem, Darmstadt

⁵⁵ CLN, Freising

⁵⁶ Fluka, Buchs, Schweiz

8% Phosphorsäure (85%) 94 ml

Aluminiumsulfat in Aqua bidest. lösen. Ethanol und Coomassie Brilliant Blue hinzugeben und lösen. Phosphorsäure hinzufügen und auf 1000 ml mit Aqua bidest. auffüllen.

Entfärbelösung

2% Phosphorsäure⁵⁷ (85%) 23,5 ml

10% Ethanol (99,99%) 100 ml

Phosphorsäure und Ethanol mischen und auf 1000 ml auffüllen.

3.5.6.2 Durchführung der Coomassie-Färbung nach Kang

Die Färbung der SDS-Gele erfolgte durch eine sensitive Coomassie-Färbung, die nach Kang modifiziert wurde (KANG et al., 2002). Die Gele wurden nach der Beendigung der Elektrophorese aus den Gelkassetten genommen und 3x für je 10 min in Aqua dest. gewaschen. Im Anschluss wurden die Gele mit der Färbelösung bedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die gefärbten Gele erneut 3 x je 10 min mit Aqua dest. gewaschen und anschließend für eine Stunde in die Entfärbelösung gelegt, um die Hintergrundfärbung zu entfernen. Danach wurden die Gele nochmals 3 x je 10 min mit Aqua dest. gewaschen. Zuletzt wurden die gefärbten Gele mit dem Amersham Imager680, Analysis 2.0⁵⁸ dokumentiert.

3.5.6.3 Berechnung des molekularen Gewichts einer unbekanntem Bande

Trotz der Verwendung eines Proteinbandenmarkers, kann das molekulare Gewicht von Proteinbanden, die zwischen zwei Markerbanden liegen, nur geschätzt werden.

⁵⁷ Applichem, Darmstadt

⁵⁸ GE Healthcare, Freiburg

Daher wurde das molekulare Gewicht der Proteinbanden durch das Erstellen eines Graphen, der auf den Proteinmarkerbanden beruht, ermittelt. Dafür wurden die Migrationsdistanzen der jeweiligen Proteinmarkerbanden anhand der eingescannten Gele ermittelt und durch die Migrationsdistanz der gesamten Färbefront geteilt. Die so festgelegten Punkte wurden dann genutzt, um einen Graphen zu erstellen. Zur Berechnung des molekularen Gewichts einer unbekanntes Bande, wird die Migrationsdistanz der unbekanntes Bande ermittelt und durch die Migrationsdistanz der gesamten Färbefront geteilt. Das Ergebnis davon wird als X-Wert in den Graphen eingesetzt und die Auflösung nach Y ergibt das molekulare Gewicht der unbekanntes Bande.

3.5.6.4 Quantifizierung und statistische Auswertung der Proteinbanden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die SDS-Gele der Jacalin-Präzipitation quantifiziert und statistisch ausgewertet (siehe Kapitel 4.3.1). Die Quantifizierung der Banden wurde mit der ImageJ Software Version 1.54g (SCHNEIDER et al., 2012) durchgeführt. Dazu wurden die eingescannten farbigen Gele zuerst in Graustufen formatiert, sodass ImageJ die Schwärzung der Banden berechnen konnte. Der Mann-Whitney-U-Test wurde durchgeführt, um signifikante Unterschiede zu untersuchen. Das Ergebnis wurde als statistisch signifikant angesehen, wenn der p -Wert kleiner gleich 0,05 war.

3.6 Inhibition der JAC-Bindung an Neutrophile

3.6.1 Puffer und Lösungen

PBS, pH 7,4

Siehe Kapitel 3.3.1

Galaktose-Lösung (20%)

Galaktose⁵⁹ 1 g

In 5 ml PBS lösen.

Mannose-Lösung (20%)

Mannose⁶⁰ 1 g

In 5 ml PBS lösen.

Sukrose-Lösung (20%)

Sukrose⁶¹ 1 g

In 5 ml PBS lösen.

3.6.2 Pflanzenlektine und verwendete Zucker

Die verwendeten Pflanzenlektine und verwendete Zucker sind in den folgenden Tabellen aufgeführt:

Pflanzenlektin	Firma	Koppelung	Eingesetzte Konzentration
Jacalin (JAC)	Biozol, Eching	FITC gekoppelt	1 µg/ml

⁵⁹ Merck KGaA, Darmstadt

⁶⁰ Merck KGaA, Darmstadt

⁶¹ Merck KGaA, Darmstadt

Zucker	Firma	Eingesetzte Konzentration
Galaktose	Merck KGaA, Darmstadt	20% in PBS
Mannose	Merck KGaA, Darmstadt	20% in PBS
Sukrose	Merck KGaA, Darmstadt	20% in PBS

3.6.3 Zuckereinhibierung des JAC und anschließende Färbung

Equine Neutrophile wurden mit einer Zellzahl von 5×10^5 Zellen pro Delle in eine 96-Loch-Platte mit U-Boden ausgesät und daraufhin bei 400 rcf für 2 min bei RT abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Mindestens 30 min vor der Verwendung, wurde das FITC-gekoppelte JAC mit einer jeweils 20%igen Zuckerlösung gemischt, um die Bindungsstellen von JAC zu inhibieren. Dann wurde jeweils 30 μ l des FITC-gekoppelten und inhibierten JACs in einer Konzentration von 1 μ g/ml in je eine Delle gegeben und bei RT 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Dellen mit 170 μ l PBS bei 400 rcf für 2 min bei RT gewaschen und anschließend der Überstand dekantiert. Zuletzt wurden die markierten und gefärbten Zellen mit 200 μ l PBS resuspendiert und mittels Durchflusszytometrie gemessen, um die Bindungseigenschaften von Pflanzenlektinen über die Fluoreszenzmarkierung analysieren zu können.

3.6.4 Detektion mittels Durchflusszytometrie

Siehe Kapitel 3.3.5

3.6.5 Auswertung und Statistik

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurde mit der Flowlogic Software⁶² V7 durchgeführt. Dazu wurden zunächst im Dotplot (hier entspricht jede Zelle einem Punkt) mit den Parametern Forward-Scatter (FSC; zeigt die Größe der Zellen) und Sideward-Scatter (SSC; zeigt die Granularität der Zellen) die Granulozyten ausgewählt. Anschließend wurde in dieser Population der Ausschluss von Dubletten durchgeführt. Hierfür wurden die zwei Signalparameter Höhe (H) und Fläche (A) des FSC im Dotplot dargestellt. Dadurch wurden ausschließlich intakte und einzelne Zellen in die Auswertung einbezogen. Anschließend wurde Bindungsstärke der Pflanzenlektine auf den einzelnen intakten Granulozyten analysiert. Dazu wurden die gemessenen und Daten als Histogramm dargestellt, mit der mittleren Fluoreszenzintensität (*engl.* mean fluorescence intensity, MFI) auf der X-Achse und der Zellzahl auf der Y-Achse. Die Position des Histogramms auf der X-Achse ergab die Bindungsintensität für das jeweils untersuchte Pflanzenlektin. Diese wurde anschließend mit folgender Formel normalisiert:

$$\textit{normalisierte MFI} = \frac{\textit{MFI Pflanzenlektinsfärbung}}{\textit{MFI ohne Pflanzenlektinfärbung}}$$

Anschließend wurden pro Tier die normalisierten MFI-Werte der Messungen mit inhibiertem JAC durch Division mit den MFI-Werten des nicht-inhibierten JAC skaliert, und mit 100 multipliziert. Die resultierenden Werte stellen einen relativen Faktor in Prozent dar.

⁶² Inivai Technologies, Mentone Victoria, Australien

3.7 Evaluation von proteomischen Daten von Neutrophilen Granulozyten

3.7.1 Verwendung des Datensatzes PXD013648

Für die proteomische Analyse der Neutrophilen wurde der Datensatz PXD013648 verwendet. Dieser Datensatz zeigt vergleichend das Gesamtproteom von Neutrophilen gesunder und an ERU erkrankter Pferde (WEIGAND et al., 2021) und wurde auf dem ProteomeXchange Konsortium via PRIDE-Datenbank (<https://www.ebi.ac.uk/pride/>) frei zugänglich veröffentlicht wurde (PEREZ-RIVEROL et al., 2019). Dadurch wurde eine Konsistenz und Reproduzierbarkeit auf Grundlage von etablierten Arbeitsabläufen gewährleistet.

3.7.2 Berechnung von möglichen O-Glykosylierungen via NetOGlyc 4.0

Mithilfe von NetOGlyc 4.0 (STEENTOFT et al., 2013) wurde durch die Eingabe der Proteinsequenzen im FASTA-Format (PEARSON und LIPMAN, 1988) berechnet, an welchen Stellen und mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Protein eine O-GalNAc Glykosylierung aufweist. Dabei wurden Proteine als O-GalNAc glykosyliert erachtet, wenn an mehreren Stellen mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 50% O-glykosyliert sind.

4 ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung der Oberflächenglykosylierung von equinen Neutrophilen

Neutrophile Granulozyten sind ein hochinteressantes Forschungsgebiet, das stetig an Bedeutung gewinnt, seit bekannt ist, wie heterogen diese Zellen in ihrer Funktion sind. In T-Zell getriebenen Autoimmunerkrankungen, wie der ERU, spielen Neutrophile eine wichtige Rolle (DEGROOTE et al., 2023). Damit konnte unsere Arbeitsgruppe bereits nachweisen, dass Neutrophile aus dem peripheren Blut von an ERU erkrankten Pferden sich in ihrem Proteom und in ihrer Funktion von Neutrophilen aus dem Blut gesunder Pferde unterscheiden und somit maßgeblich an der Pathogenese der ERU beteiligt sein könnten (DEGROOTE et al., 2023). Allerdings liegen bisher keine Erkenntnisse vor über die Oberflächenglykosylierung von equinen Neutrophilen sowie mögliche Veränderungen in T-Zell getriebenen Erkrankungen wie der ERU (Stand der Pubmed-Recherche, Stand: 27.08.2025)

Zur Charakterisierung der Oberflächenglykosylierung von Neutrophilen aus dem Blut gesunder und an ERU erkrankten Pferden wurden 35 Pflanzenlektine verwendet. Diese Pflanzenlektine binden spezifisch an genau definierte Glykanstrukturen (Tabelle 4.1) und ermöglichten somit eine detaillierte Beschreibung der an der Neutrophilen-Oberfläche vorkommenden Glykanstrukturen, wie es bereits in Kapitel 2.2.3 beschreiben wurde. Um eine bessere Übersicht zu erhalten, wurden die Pflanzenlektine in Gruppen mit ähnlichen Bindungseigenschaften eingeteilt. Die Gruppen beschreiben dabei die Bindungsspezifitäten. Allerdings haben viele Pflanzenlektine mehrere Bindungsspezifitäten, die auch in andere Gruppen eingeordnet werden können. Die Bindungsintensitäten wurden nach den Mittelwerten der normalisierten MFI-Werte eingeteilt. Ein Mittelwert unter 5 wurde dabei als keine bis geringe, zwischen 5 und 100 als mittlere und über 100 als starke Bindung angesehen.

4.1.1 O-Glykan-bindende Pflanzenlektine

Von den 35 verwendeten Pflanzenlektinen konnten vier genutzt werden, um spezifisch O-Glykane zu binden und damit nachzuweisen. Diese sind ACL (Abbildung 4.1 A), JAC (Abbildung 4.1 B), MAL-2 (Abbildung 4.1 C) und PNA (Abbildung 4.1 D). ACL erkennt Core 1- und Core 2 O-Glykane (siehe Kapitel 2.2.1), sowie Poly-Lewis-Strukturen auf der Oberfläche equiner Neutrophiler. JAC bindet ebenso an Core 1 O-Glykane, allerdings auch an Core 3 O-Glykane und toleriert dabei Substitutionen am C3-Kohlenstoffatom des α -GalNAc-Epitopes (Tabelle 4.1). Dagegen detektiert PNA Core 1 und Core 2 O-Glykane (Tabelle 4.1). Das Pflanzenlektin MAL-2 interagiert mit α 2,3-sialylierten O-Glykanen und stellt damit eine Besonderheit in dieser Gruppe dar, da es spezifische Sialylierungen nachweisen kann (Tabelle 4.1). Alle genannten O-Glykane konnten durch den Einsatz der vier Pflanzenlektine auf der Zelloberfläche mit mittlerer bis starker Häufigkeit nachgewiesen werden. Jene Glykane, die von ACL, MAL-2 und PNA auf der Neutrophilenoberfläche detektiert wurden, zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrolltieren und an ERU erkrankten Pferden (Abbildung 4.1 A, C, D; Tabelle 4.1). Allerdings konnte auf Neutrophilen von ERU-Pferden ein sehr signifikanter Anstieg von JAC-bindenden O-Glykanen gezeigt werden (Abbildung 4.1 B; Tabelle 4.1), der im Vergleich zu den Kontrolltieren mehr als zweifach erhöht war (** $p = 0.0012$, Abbildung 4.1 B).

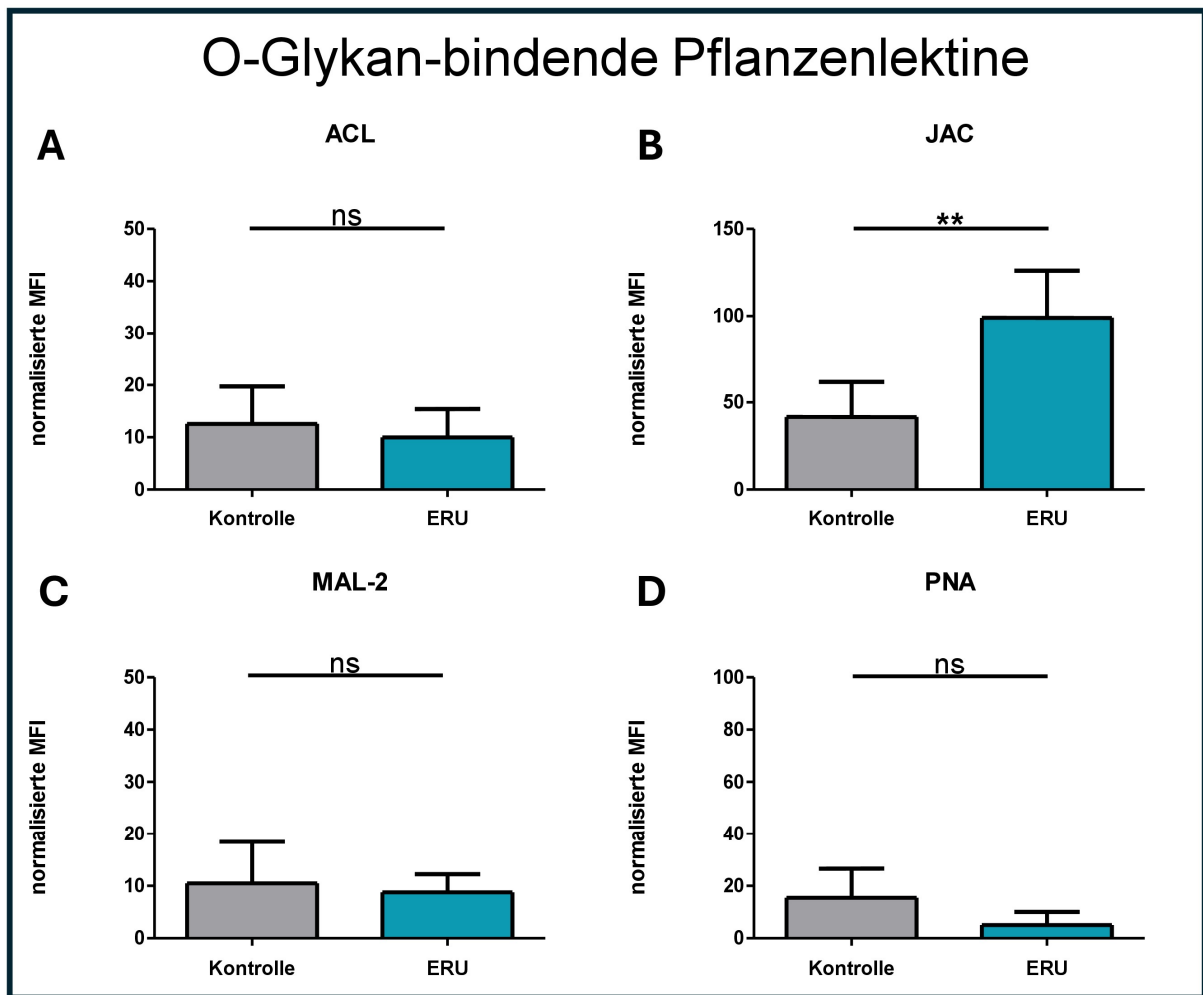


Abbildung 4.1 Bindungsverhalten von O-Glykan-bindenden Pflanzenlektinen auf der Zelloberfläche der Neutrophilen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden. Es ist die Expressionsstärke der O-Glykane, die von ACL (A), JAC (B), MAL-2 (C) und PNA (D) detektiert wurden, dargestellt. Die Balkendiagramme der gesunden (grau; n = 5 - 7) und an ERU erkrankten Pferde (blau; n = 9 - 11) repräsentieren den Mittelwert der normalisierten MFI (siehe Kapitel 3.3.6) und die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Es konnte bei (B) ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und ERU festgestellt werden (** $p = 0.0012$; Students t-Test mit Welchs-Korrektur). (A), (C) und (D) sind im Vergleich nicht signifikant unterschiedlich (ns = nicht signifikant; Students t-Test mit Welchs-Korrektur oder Mann-Whitney-U-Test).

4.1.2 N-Glykan-bindende Pflanzenlektine

Das Pflanzenlektin ABL favorisiert N-Glykane mit zwei Verzweigungen, die mit einer β -gebundenen N-Acetylglukosaminstruktur (GlcNAc) enden (Tabelle 4.1). Daneben erkennt es mit geringer Affinität auch Core 2 O-Glykane (Tabelle 4.1). Sehr komplexe N-Glykane werden von DSL detektiert, diese sind über β 1,4- oder β 1,6-GlcNAc verbunden und enthalten oft Chitobiose oder Chitotriose. Daneben erkennt es auch weit verzweigte Oligomere, die mehrmals wiederholende Typ 2 LacNAc enthalten (Tabelle 4.1). PHA-E und PHA-L sind zwei weitere Pflanzenlektine, die N-Glykane binden. Während PHA-E eine starke Affinität zu Strukturen hat, die im mittleren Ast des N-Glykans ein GlcNAc haben (*engl.* bisecting GlcNAc), bindet PHA-L vorzugsweise β 1,6-verzweigte N-Glykane (Tabelle 4.1). Die von PHA-E gebundenen Glykane wurde sehr stark auf der Neutrophilenoberfläche exprimiert (Abbildung 4.2 C). Ebenfalls stark exprimiert wurden die von ABL gebundenen Glykane (Abbildung 4.2 A). Dagegen sind die von PHA-L und DSL detektierten Strukturen in einer etwas geringeren Abundanz auf der Oberfläche der equinen Neutrophilen vorhanden (Abbildung 4.2 B, D; Tabelle 4.1). Keines der hier benannten Glykane zeigte einen signifikanten Unterschied auf der Oberfläche der Neutrophilen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden (Tabelle 4.1).

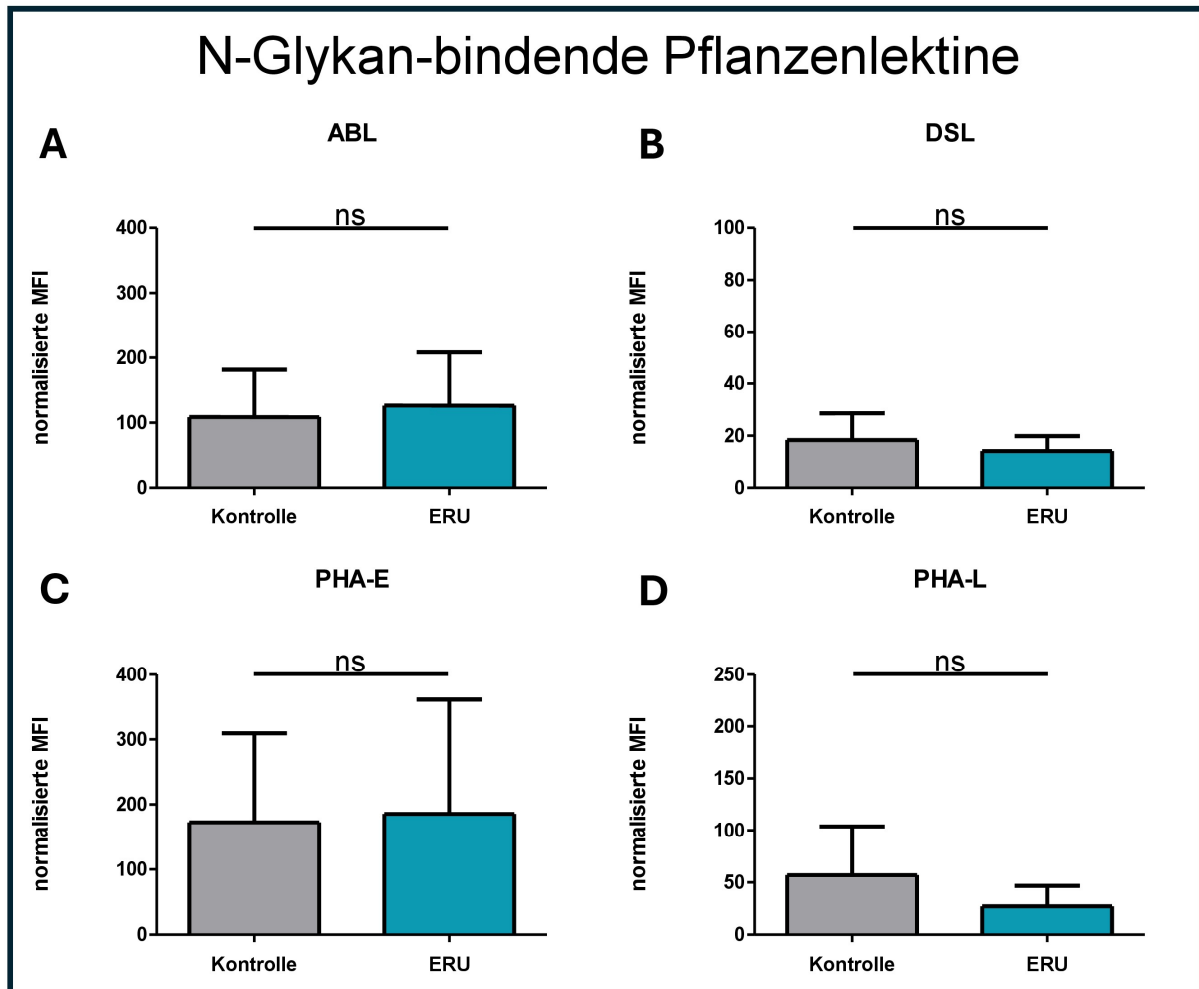


Abbildung 4.2 Bindungsverhalten von N-Glykan-bindenden Pflanzenlektinen auf der Zelloberfläche der Neutrophilen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden. Es ist die Expressionsstärke der N-Glykane, die von ABL (A), DSL (B), PHA-E (C) und PHA-L (D) detektiert werden, dargestellt. Die Balkendiagramme der gesunden (grau; n = 5 - 7) und an ERU erkrankten Pferde (blau; n = 9 - 11) repräsentieren den Mittelwert der normalisierten MFI (siehe Kapitel 3.3.6) und die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Es konnte bei keiner Glykosylierung ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und ERU festgestellt werden (ns = nicht signifikant; Students t-Test mit Welchs-Korrektur oder Mann-Whitney-U-Test).

4.1.3 Mannose-bindendene Pflanzenlektine

Das aus der Banane gewonnene Pflanzenlektin BanLec verfügt über Bindungsstellen für interne α 1,3-Glukosyl- und -Mannosylstrukturen und erkennt zudem reduzierende terminale α 1,3- und α 1,6-Glukosylstrukturen (Tabelle 4.1). ConA dagegen detektiert terminal gebundene α -Mannosen, die potenziell auch von HHL prioritär identifiziert werden (Tabelle 4.1). Allerdings detektiert ConA zusätzlich biantennäre N-Glykane mit multiplen Erweiterungen (Tabelle 4.1). Spezifischer agieren die Pflanzenlektine GNL und NPL. Beide Pflanzenlektine binden bevorzugt an terminale α 1,6-gebundene Mannose, es wird aber auch von einer Affinität zu α 1,3-gebundener Mannose berichtet (Tabelle 4.1). Zudem erkennen beide Pflanzenlektine auch kurze terminale LacNAc (Tabelle 4.1). Die terminal gebundene α -Mannosen, die von HHL detektiert wurden, waren auf den Neutrophilen in beiden Vergleichsgruppen nur sehr gering nachweisbar (Abbildung 4.3 D). ConA-gebundene Strukturen wurden stark exprimiert (Abbildung 4.3 B). Das spricht für ein hohes Aufkommen von biantennären N-Glykanen auf der Neutrophilenoberfläche von Pferden. Die von BanLec identifizierten Glukosyl- und Mannosylstrukturen wurden signifikant geringer auf der Zelloberfläche von ERU-Neutrophilen exprimiert (* $p = 0,0163$; Tabelle 4.1, Abbildung 4.3 A). Die weiteren Glykanverbindungen zeigten keinen signifikanten Unterschied in ihrer Ausprägung auf der Neutrophilenoberfläche von gesunden und an ERU erkrankten Pferden (Abbildung 4.3 C, E, Tabelle 4.1).

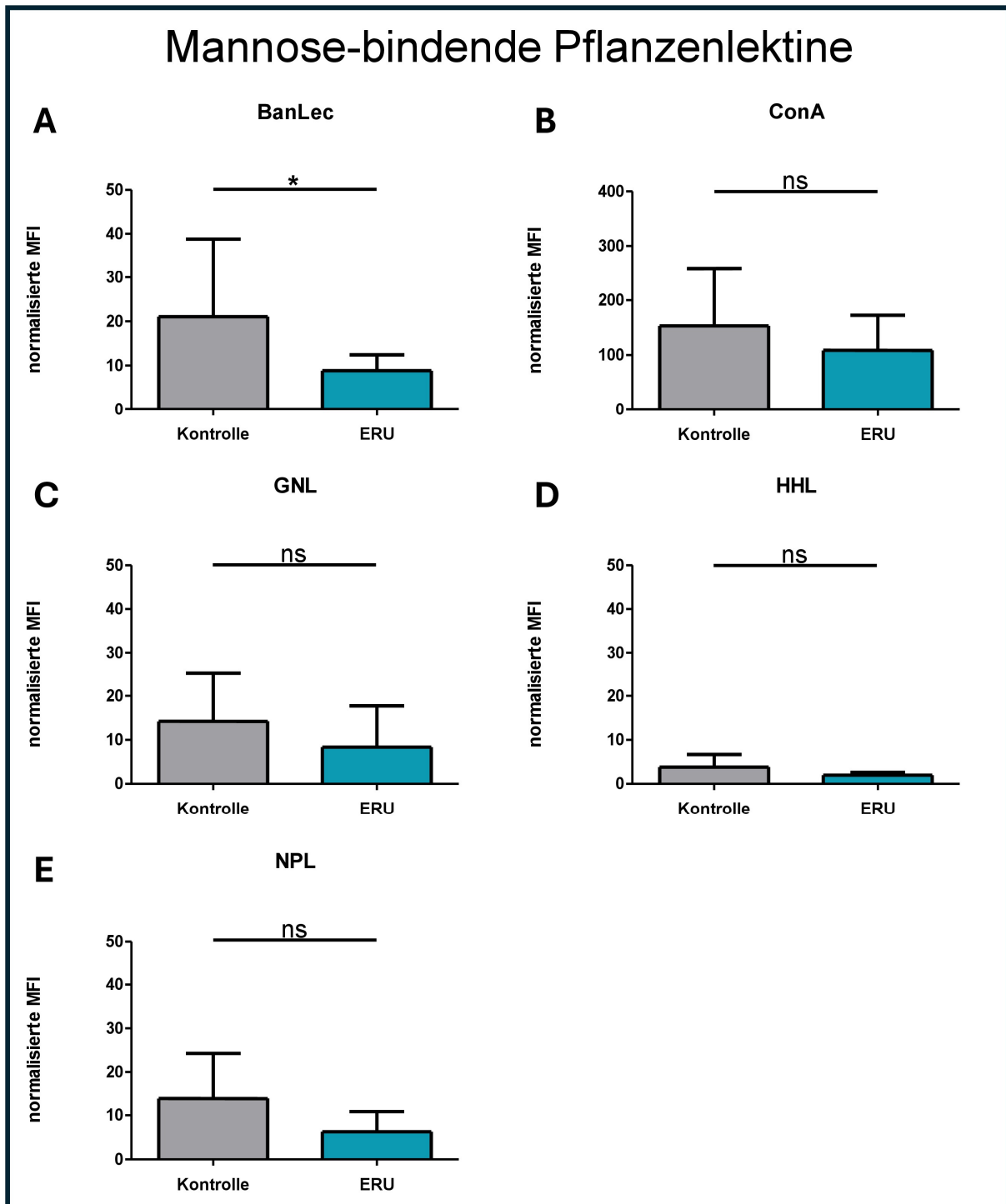


Abbildung 4.3 Bindungsverhalten von Mannose-bindenden Pflanzenlektinen auf der Zelloberfläche der Neutrophilen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden. Es ist die Expressionsstärke der Mannose-haltigen Glykane, die von BanLec (A), ConA (B), GNL (C), HHL (D) und NPL (E) detektiert wurden, dargestellt. Die Balkendiagramme der gesunden (grau; n = 7) und an ERU erkrankten Pferde (blau; n = 10-11) repräsentieren den Mittelwert der normalisierten MFI (siehe Kapitel 3.3.6) und die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Es konnte bei (A) ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den

Kontrollen und ERU festgestellt werden (* $p = 0.0163$; Students t-Test mit Welchs-Korrektur). (B), (C), (D) und (E) sind im Vergleich nicht signifikant unterschiedlich (ns = nicht signifikant; Students t-Test mit Welchs-Korrektur oder Mann-Whitney-U-Test).

4.1.4 Fukose-bindende Pflanzenlektine

Viele Arten der α -gebundenen Fukosestrukturen werden durch AAL erkannt. Eine besondere Präferenz ist dabei eine Typ 2 LacNAc-Struktur, die mit einer α 1,2-gebundenen Fukosestruktur endet (Tabelle 4.1). LCA und PSA priorisieren Core-Fukosylierungen (Tabelle 4.1). Das sind N-Glykan-Verbindungen, die eine über α 1,6-gebundene Fukose am GlcNAc tragen, dass wiederum an Asparagin gebunden ist. (BOJAR et al., 2022). Allerdings kann das Anhängen von weitere Fukosylierungen (LCA) oder dem bisektierten GlcNAc (LCA, PSA), eine Bindung inhibieren (BOJAR et al., 2022). Neben den bereits genannten Fukosestrukturen, erkennt LCA auch α 1,2-gebundene Mannose (Tabelle 4.1). Das Pflanzenlektin LTL bindet nur Oligosaccharide, die α 1,3-gebundene Fukosestrukturen enthalten (Tabelle 4.1). Wiederum sehr spezifisch erkennt PTL Strukturen, die ein α 1,3-gebundenes GlcNAc oder und eine α 1,2-gebundenen Fukosestruktur beinhalten (Tabelle 4.1). Eine solche Struktur ist dabei das H-Antigen, dass die Grundlage des ABO-Blutgruppensystems bildet (ACHARYA et al., 1990). Eine α 1,2-gebundene Fukose mit einer β 1,4-gebundene Galaktose wurde von UEA-1 identifiziert (Tabelle 4.1). Die von AAL, LCA und PSA gebundenen Glykanstrukturen wurden in starker bis mittlerer Intensität auf der equinen Neutrophilenoberfläche nachgewiesen (Abbildung 4.4 A, B und D; Tabelle 4.1). Hingegen wurden die Glykane, die von LTL, PTL und UEA-1 erkannt wurden nicht bis nur sehr schwach detektiert (Abbildung 4.4 C, E und F; Tabelle 4.1). Alle auf der Neutrophilenoberfläche charakterisierten, Fukose-haltigen Glykane zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollen und den an ERU erkrankten Tieren (Abbildung 4.4; Tabelle 4.1).

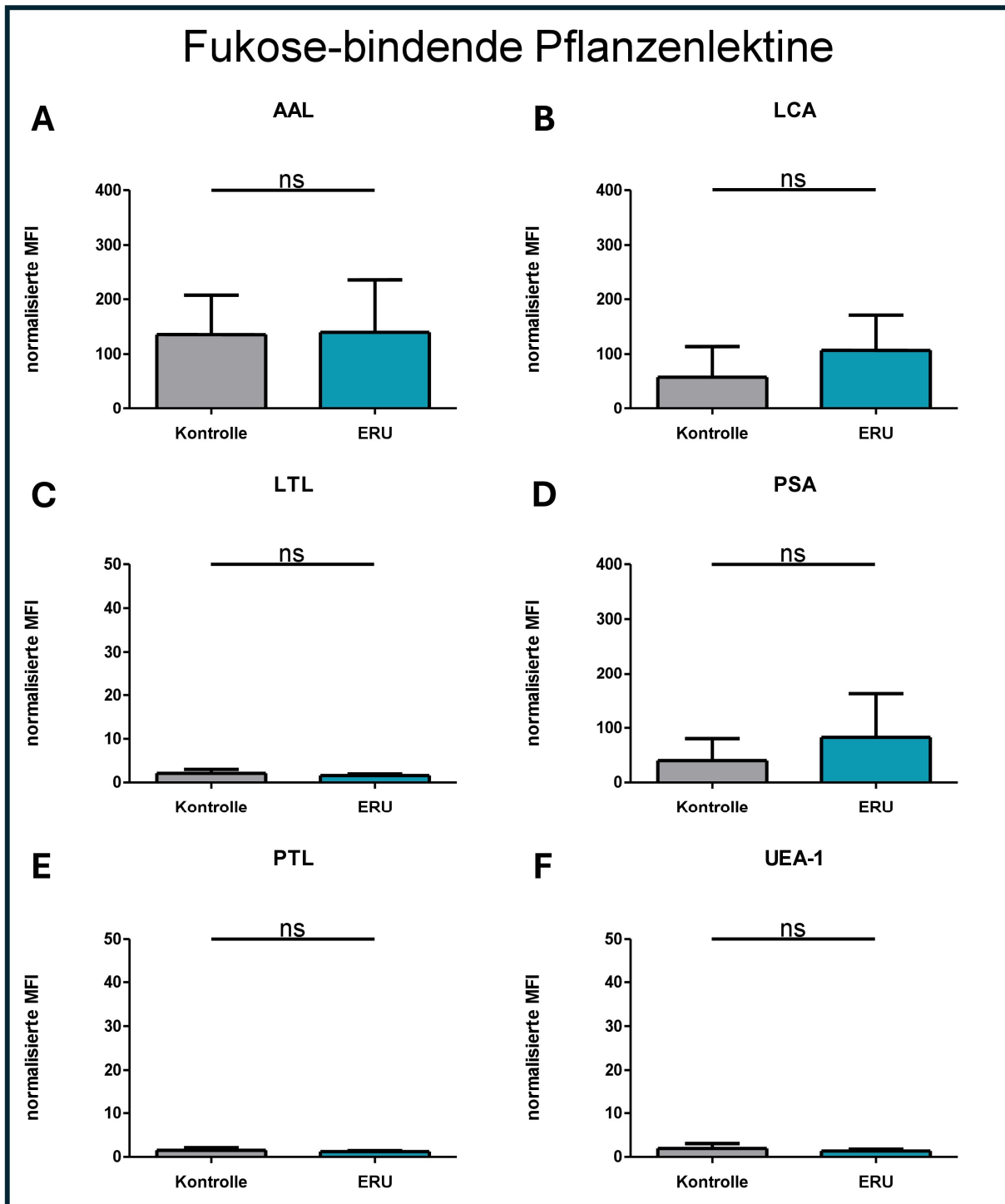


Abbildung 4.4 Bindungsverhalten von Fukose-bindenden Pflanzenlektinen auf der Zelloberfläche der Neutrophilen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden. Es ist die Expressionsstärke der Fukose-enhaltenden Glykanen, die von AAL (A), LCA (B), LTL (C), PSA (D), PTL (E) und UEA-1 (F) detektiert wurden, dargestellt. Die Balkendiagramme der gesunden (grau; n = 5 - 7) und an ERU erkrankten Pferde (blau; n = 9 - 11) repräsentieren den Mittelwert der normalisierten MFI (siehe Kapitel 3.3.6) und die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Es konnte bei keiner Glykosylierung ein statistisch signifikanter

Unterschied zwischen den Kontrollen und ERU festgestellt werden (ns = nicht signifikant; Students t-Test mit Welchs-Korrektur oder Mann-Whitney-U-Test).

4.1.5 Terminale Galaktose- und N-Acetyllaktosamin-bindende Pflanzenlektine

Glykane, die mit einer β -gebundenen Galaktose enden, werden von BPL erkannt. Toleriert werden dabei auch terminal β -gebundene GalNAc. Eine starke Affinität zu Typ 2 LacNAc hat RCA-I und ECL (Tabelle 4.1). RCA-I erkennt aber auch andere β -gebundenen Galaktose-Strukturen. ECL identifizierte zudem Typ 2 N-Acetylgalaktosamin- β 1-4-N-Acetylglucosamin (LacdiNAc)-Strukturen, die indes auch von LEL und STL gebunden werden (Tabelle 4.1). Zusätzlich bindet LEL 2 polyLacNAc und Chitin-Oligomere (Tabelle 4.1). Enden Glykane mit einer α -gebundenen Galaktose oder einem GalNAc werden sie von GSL-I detektiert (Tabelle 4.1). GSL-I-B4 hingegen erkennt ausschließlich terminale α -Galaktosestrukturen (Tabelle 4.1). SJA bindet priorisiert terminale poly- oder multiantennäre Typ 2 LacNAc oder LacdiNAc oder das Blutgruppenantigen B (Tabelle 4.1). Neben der vorher bereits erwähnten Bindungsspezifität von STL zu Typ 2 LacdiNAc-Strukturen, bindet dieses Pflanzenlektin auch interne Typ 2 LacNAc als lineares Glykan und Chitin-Oligomere (Tabelle 4.1). Diese Strukturen lagen auf der Zelloberfläche von equinen Neutrophilen nicht vor, wie auch die weiteren Bindungsspezifitäten von SJA, da keine der von STL und SJA gebundenen Glykane nachgewiesen wurde (Abbildung 4.5 G, H; Tabelle 4.1). Alle anderen vorgestellten Glykane wurden dagegen in mittlerer Expressionsstärke identifiziert (Abbildung 4.5 A-F; Tabelle 4.1). Vor allem terminale Typ 2 LacNAc, die von RCA-I gebunden wurden, waren stark auf den Neutrophilen des Pferdes ausgeprägt (Abbildung 4.5 F; Tabelle 4.1). Keine der genannten Verbindungen zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Neutrophilen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden (Abbildung 4.5; Tabelle 4.1).

Terminal Gal- und LacNAc-bindende Pflanzenlektine

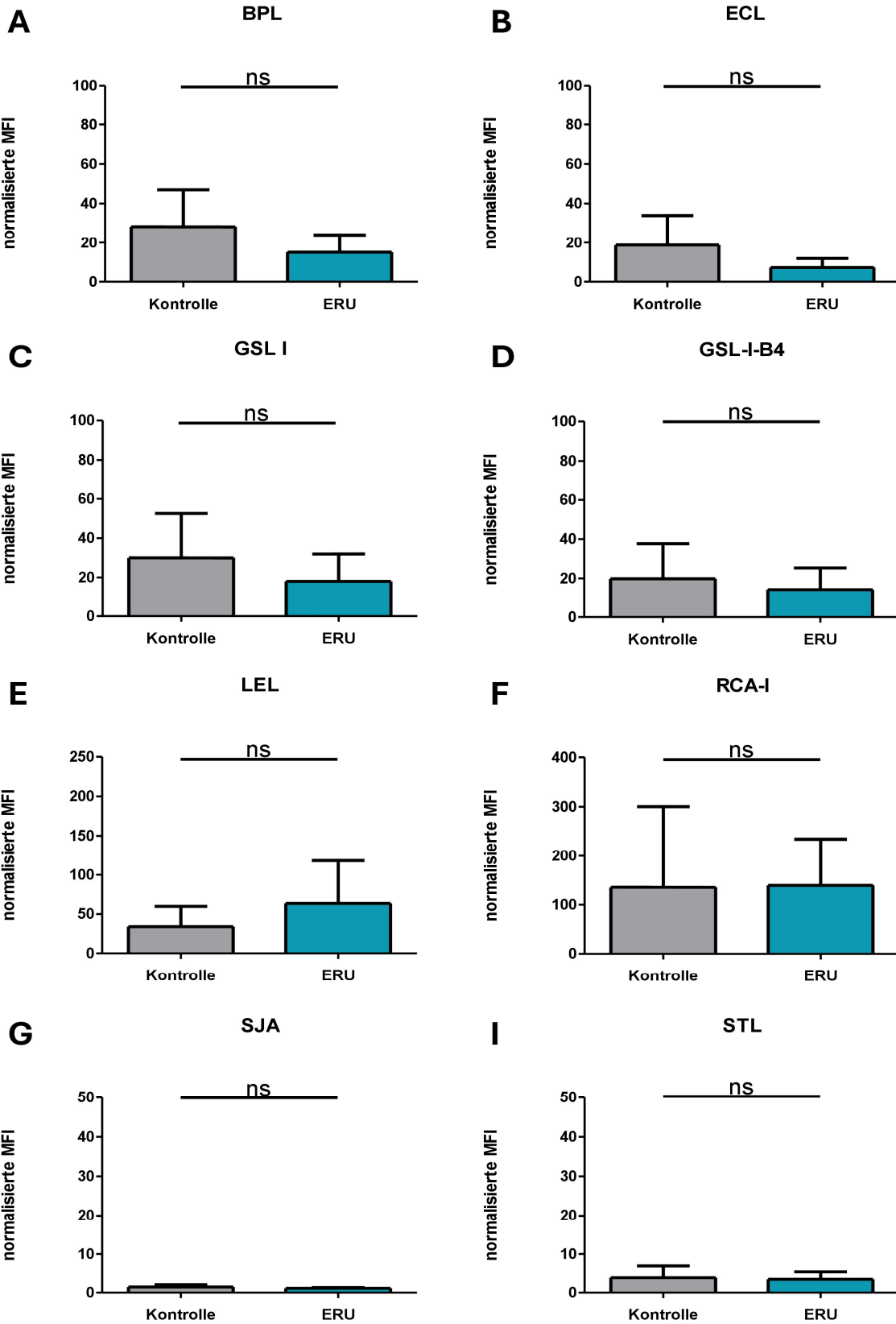


Abbildung 4.5 Bindungsverhaltens von Galaktose und N-Acetyllaktosamin-bindenden Pflanzenlektinen auf der Zelloberfläche der Neutrophilen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden. Es ist die Expressionsstärke dieser Glykane, die von BPL (A), ECL (B), GSL-I (C), GSL-IB-4 (D), LEL (E), RCA-I (F), SJA (G) und STL (H) detektiert wurden, dargestellt. Die Balkendiagramme der gesunden (grau; n = 5 - 7) und an ERU erkrankten Pferde (blau; n = 9 - 11) repräsentieren den Mittelwert der normalisierten MFI (siehe Kapitel 3.3.6) und die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Es konnte bei keiner Glykosylierung ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und ERU festgestellt werden (ns = nicht signifikant; Students t-Test mit Welchs-Korrektur oder Mann-Whitney-U-Test).

4.1.6 Terminalen N-Acetylgalaktosamin-bindende Pflanzenlektine

Terminale GalNAc-Strukturen, die α - oder β -gebunden sind werden von SBA, VVA und WFA identifiziert (Tabelle 4.1). Das Forssman Antigen, eine GalNAc α 1-3GalNAc β -Verbindung, wird von DBA präferiert (Tabelle 4.1). VVA kann zusätzlich an terminale LacdiNAc binden und WFA an terminale LacNAc (Tabelle 4.1). Nur die von WFA gebundenen Glykanstrukturen konnten sowohl bei den gesunden als auch aus den an ERU erkrankten Pferden isolierten Neutrophilen auf der Oberfläche mit geringer bis mittlerer Expression festgestellt werden (Abbildung 4.6 D). Die verbleibenden Glykanstrukturen konnten kaum nachgewiesen werden (Abbildung 4.6 A-C, Tabelle 4.1). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den an ERU erkrankten Tieren (Abbildung 4.6; Tabelle 4.1).

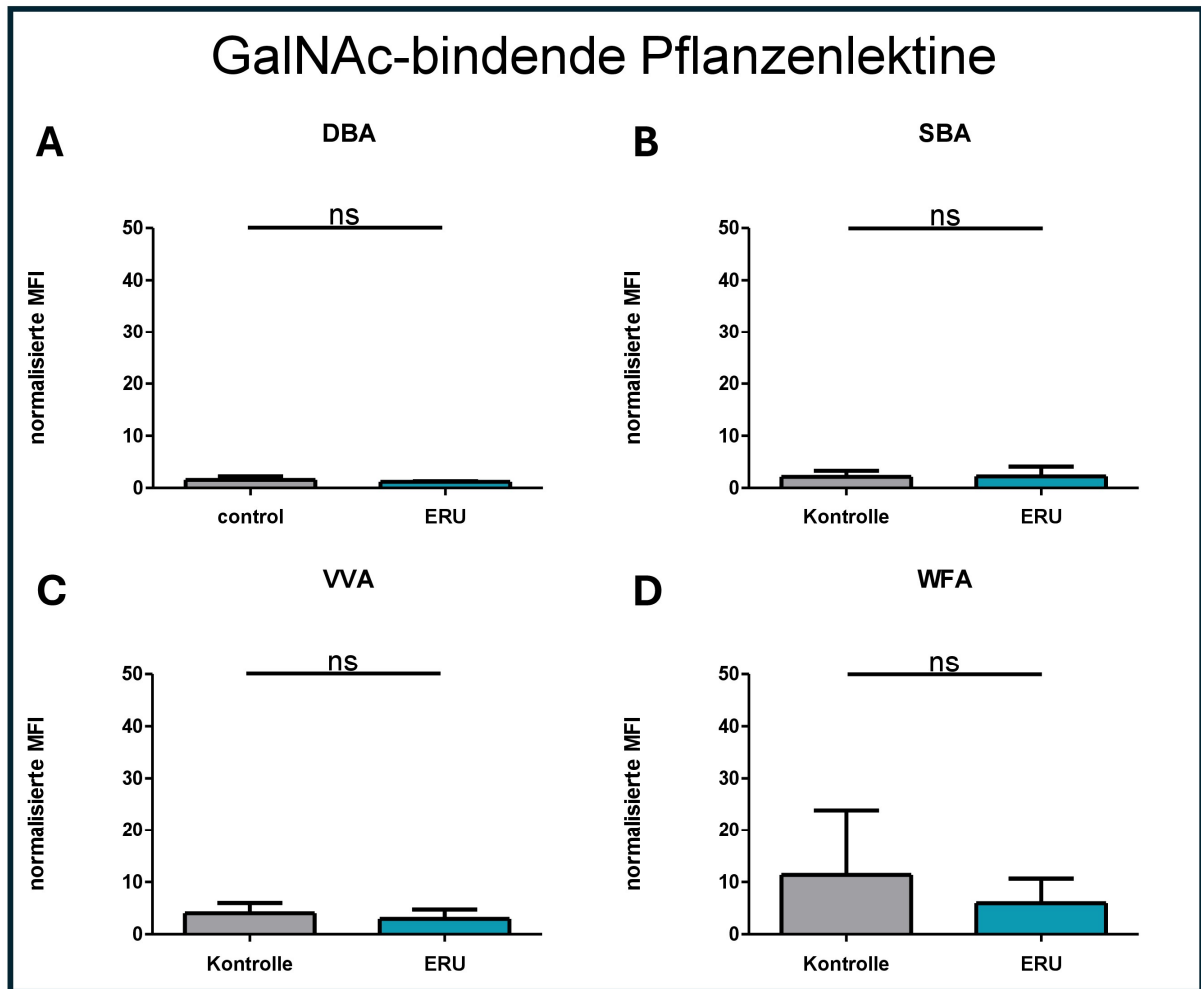


Abbildung 4.6 Bindungsverhaltens von N-Acetylgalaktosamin-bindenden Pflanzenlektinen auf der Zelloberfläche der Neutrophilen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden. Es ist die Expressionsstärke N-Acetylgalaktosamin-bindenden Glykanen, die von DBA (A), SBA (B), VVA (C) und WFA (D) detektiert wurden, dargestellt. Die Balkendiagramme der gesunden (grau; n = 7) und an ERU erkrankten Pferde (blau; n = 9 - 11) repräsentieren den Mittelwert der normalisierten MFI (siehe Kapitel 3.3.6) und die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Es konnte bei keiner Glykosylierung ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und ERU festgestellt werden (ns = nicht signifikant; Students t-Test mit Welchs-Korrektur oder Mann-Whitney-U-Test).

4.1.7 N-Acetylglukosamin- und Sulfat-bindende Pflanzenlektine

GSL-II bindet bevorzugt β -GlcNAc-Strukturen, erkennt aber auch terminale α -GlcNAc-Strukturen (Tabelle 4.1). Dieselben Strukturen bindet auch WGA, zusätzlich identifiziert dieses Pflanzenlektin auch multiple terminale N-Acetylstrukturen (Tabelle 4.1). SNA bindet an α 2,6-gebundene LacNAc- oder LacdiNAc-Strukturen (Tabelle 4.1). Es konnte kaum GSL-II bindende Glykane auf der equinen Neutrophilenoberfläche nachgewiesen werden (Tabelle 4.1; Abbildung 4.7 A). Dagegen zeigten WGA-gebundene Glykane eine mittelstarke Abundanz auf den equinen Neutrophilen (Tabelle 4.1; Abbildung 4.7 C) Ebenfalls mit mittlerer Expressionsstärke ausgeprägt, waren sialylierte α 2,6-gebundene LacNAc-Strukturen, die von SNA priorisiert wurden (Tabelle 4.1; Abbildung 4.7 B). In dieser Gruppe war ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Neutrophilen der gesunden und der an ERU erkrankten Pferde zu erkennen (Abbildung 4.7).

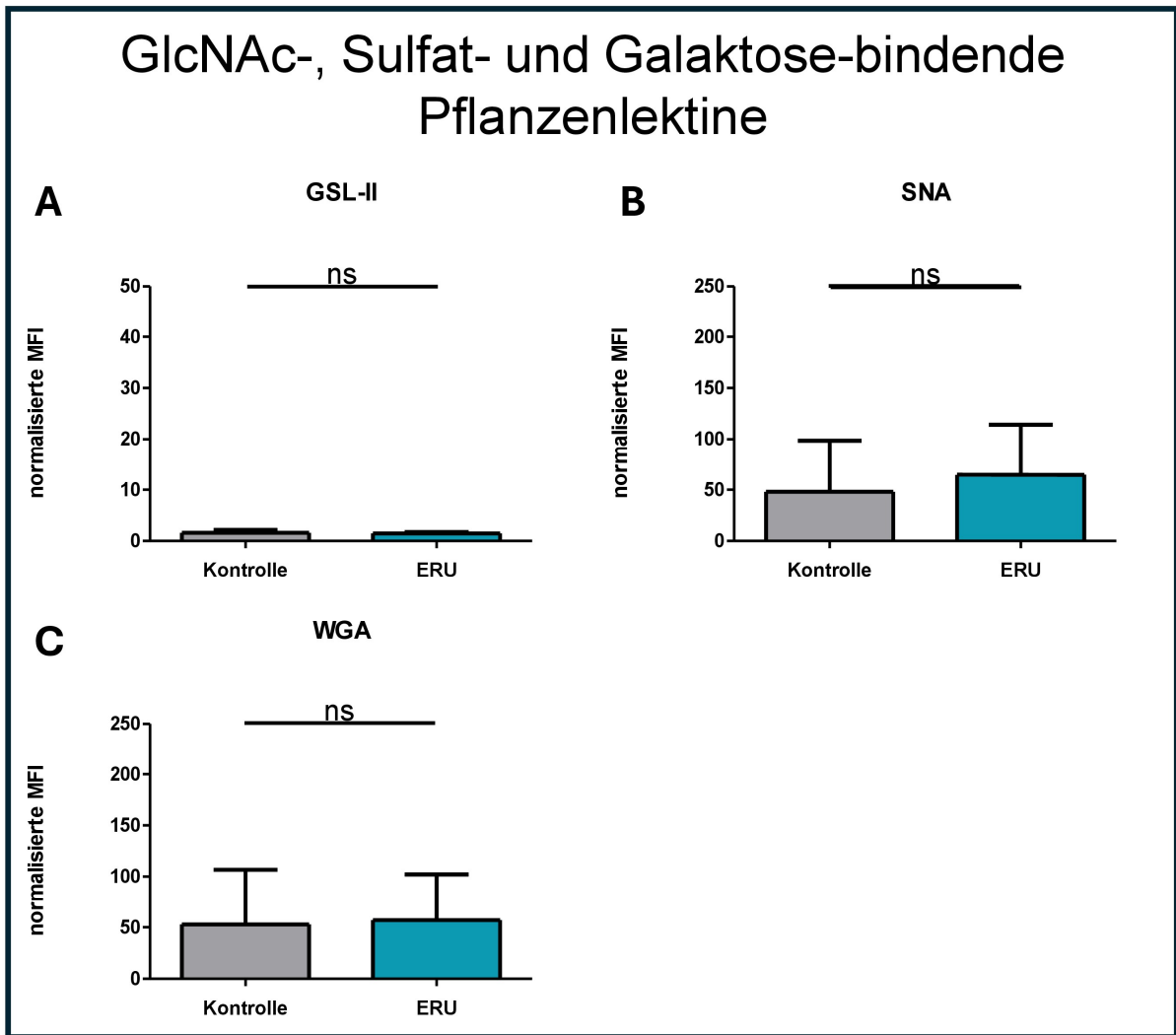


Abbildung 4.7 Bindungsverhaltens von N-Acetylglukosamin- und Sulfat-bindenden Pflanzenlektinen auf der Zelloberfläche der Neutrophilen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden. Es ist die Expressionsstärke dieser Glykane, die von GSL-II (A), SNA (B) und WGA (C) detektiert wurden, dargestellt. Die Balkendiagramme der gesunden (grau; n = 5 - 6) und an ERU erkrankten Pferde (blau; n = 9 - 11) repräsentieren den Mittelwert der normalisierten MFI (siehe Kapitel 3.3.6) und die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Es konnte bei keiner Glykosylierung ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und ERU festgestellt werden (ns = nicht signifikant; Students t-Test mit Welchs-Korrektur oder Mann-Whitney-U-Test).

ERGEBNISSE

Akronym ^a	Spezifitäten ^b	norm. MFI ± SD ^c		p-Wert ^d
		Kontrolle	ERU	
PHA-E	bisektiertes GlcNac bevorzugt mit Typ 2 LacNac	172.6 ± 136.9	185.4 ± 176.2	1.000
RCA I	terminale β-Galaktose-Reste, mit einer Präferenz für Typ 2 LacNac	135.6 ± 164.8	139.4 ± 95.0	0.9638
S-WGA	Oligosaccharide mit terminalem GlcNac	5.4 ± 3.9	5.5 ± 4.2	0.9396
AAL	α-gebundene Fucose; bevorzugt terminale α1,2-gebundene Fucosestrukturen von Typ 2 LacNac	135.6 ± 71.8	139.8 ± 95.2	0.8802
STL	interne Typ 2 LacNac als lineare Glykane; Typ 2 LacdiNac; Chitin Oligomere	3.9 ± 3.1	3.5 ± 1.9	0.8802
ABL	biantennäre N-Glykane mit terminalem β-GlcNac oder LacNac; Core 2 O-Glykane	108.7 ± 73.0	126.0 ± 82.3	0.6764
MAL-2	α2,3-sialyliertes O-Glykan	10.5 ± 7.9	8.7 ± 3.5	0.6100
GSL II	α- der β-gebundenes GlcNac, bevorzugt terminale GlcNac von LacNac in multiantennären N-Glykanen	1.6 ± 0.6	1.5 ± 0.3	0.5944
SNA	α-2,6-sialyliertes LacNac oder LacdiNac	48.0 ± 50.6	64.5 ± 49.9	0.5746
SBA	Oligosaccharidstrukturen mit terminal α- oder β-gebundenem GalNac	2.1 ± 1.2	2.2 ± 1.9	0.5220
WGA	mehrere terminale N-Acetylstrukturen; Oligosaccharide, die terminales α- oder β-gebundenes GlcNac enthalten	52.8 ± 54.1	57.1 ± 45.2	0.5136
LTL	α-1,3-gebundene Fucose enthaltende Oligosaccharide	2.1 ± 0.9	1.6 ± 0.4	0.4927
GSL-I-B4	terminale α-Galaktose-Strukturen	19.9 ± 17.8	14.3 ± 11.1	0.4777
PTL	Kohlenhydratstrukturen, die α-1,3-gebundene Galaktose und α1,2-gebundene Fucose enthalten	1.5 ± 0.6	1.2 ± 0.2	0.4482
DSL	β-1,4- und β-1,6-gebundene GlcNac-Oligomere, bevorzugt Chitobiose oder Chitotriose; verzweigte Strukturen mit mehreren Typ 2 LacNac-Wiederholungen	18.4 ± 10.2	14.1 ± 5.8	0.4271
ConA	terminal α-gebundene Mannose; biantennäre N-Glykane mit multiplen Verlängerungen	153.1 ± 105.8	108.6 ± 64.1	0.3450

ERGEBNISSE

DBA	terminale GalNAc- α 1,3-GalNAc	1.5 \pm 0.7	1.2 \pm 0.2	0.3166
SJA	terminale poly- und multiantennäre Typ 2 LacNAc oder LacdiNAc; Blutgruppe B	1.5 \pm 0.6	1.2 \pm 0.2	0.2804
WFA	Kohlenhydratstrukturen, die in α - oder β -gebundenem GalNAc enden; terminales LacNAc	11.4 \pm 12.5	5.9 \pm 4.7	0.2766
VVA	terminales α - oder β -gebundenes GalNAc, terminales β -LacdiNAc	4.0 \pm 2.0	2.9 \pm 1.8	0.2716
ACL	Core 1 und Core 2 O-Glykane; Poly-Lewis-Strukturen	12.6 \pm 7.2	10.0 \pm 5.4	0.2272
PSA	Core-Fukosestrukturen	40.0 \pm 40.5	82.7 \pm 80.0	0.2123
LEL	Typ 2 PolyLacNAc; Typ 2 LacdiNAc; Chitin-Oligomere	34.1 \pm 25.8	63.6 \pm 54.5	0.1978
LCA	Core Fukose; terminale α 1,2-Mannose	58.0 \pm 55.8	106.9 \pm 64.3	0.1714
HHL	terminale α -Mannosestrukturen	3.8 \pm 2.9	2.0 \pm 0.6	0.1711
GSL I	α -GalNAc- und α -Galaktose-Strukturen	29.9 \pm 22.7	18.0 \pm 14.0	0.1600
UEA-1	α 1,2-gebundene Fukose mit β 1,4-gebundene Galaktose	1.9 \pm 1.1	1.3 \pm 0.4	0.1521
BPL	Oligosaccharide mit terminal β -gebundener Galaktose oder β -gebundenem GalNAc	28.2 \pm 18.8	15.1 \pm 8.9	0.1282
ECL	terminales Typ 2 LacNAc und LacdiNAc	18.8 \pm 15.1	7.3 \pm 4.6	0.0993
NPL	terminale α 1,6 und α 1,3 Mannose-Strukturen; N-Glykane mit terminalem kurzem LacNAc	13.8 \pm 10.5	6.3 \pm 4.6	0.0878
PHA-L	β 1,6-gebundene N-Glykane	56.9 \pm 47.0	27.2 \pm 19.6	0.0853
GNL	terminale α -1,6 und α -1,3 Mannose-Strukturen; N-Glykane mit terminalem kurzem LacNAc	14.2 \pm 11.2	8.2 \pm 8.9	0.0700
PNA	Core 1 und Core 2 O-Glykane	15.4 \pm 11.1	5.0 \pm 5.0	0.0636
BanLec	interne α -1,3-Glukosyl- und Mannosyl-Strukturen; reduzierte terminale α 1,3 und α 1,6-Glukosyl-Strukturen	21.1 \pm 17.8	8.8 \pm 3.6	0.0163
JAC	Core 1 und Core 3 O-Glykane; 3-substituiertes α -GalNAc	41.5 \pm 20.3	98.9 \pm 27.2	0.0012

Tabelle 4.1 Bindungsspezifitäten und Abundanz auf der Zelloberfläche von allen in

dieser Studie verwendeten Pflanzenlektinen, sortiert nach der Signifikanz von Kontrolle zu ERU. (a) Akronym des Pflanzenlektins (b) Bindungsspezifitäten der Pflanzenlektine nach Bojar et al. (BOJAR et al., 2022), Singh et al. (SINGH et al., 2014), Monsigny et al. (MONSIGNY et al., 1979) und (LESCAR et al., 2002) (c) normalisierte MFI mit Standardabweichung (SD) von Kontrollen und ERU (d) p-Werte der statistischen Signifikanz der Kontrollen gegen ERU.

4.2 Inhibierung der JAC-Bindung durch verschiedene Saccharide

Die Bindung von JAC an equine Neutrophile wurde durch eine vorherige Absättigung des FITC-markierten JAC mit verschiedenen Sacchariden unterschiedlich beeinflusst. Während die Vorabsättigung mit einer 20%igen Sukroselösung keinen hemmenden Effekt auf die Bindung hatte und mit einer 20%igen Mannoselösung nur eine geringe hemmende Wirkung zeigte, wurde die JAC-Bindung mit einer 20%igen Galaktoselösung deutlich reduziert.

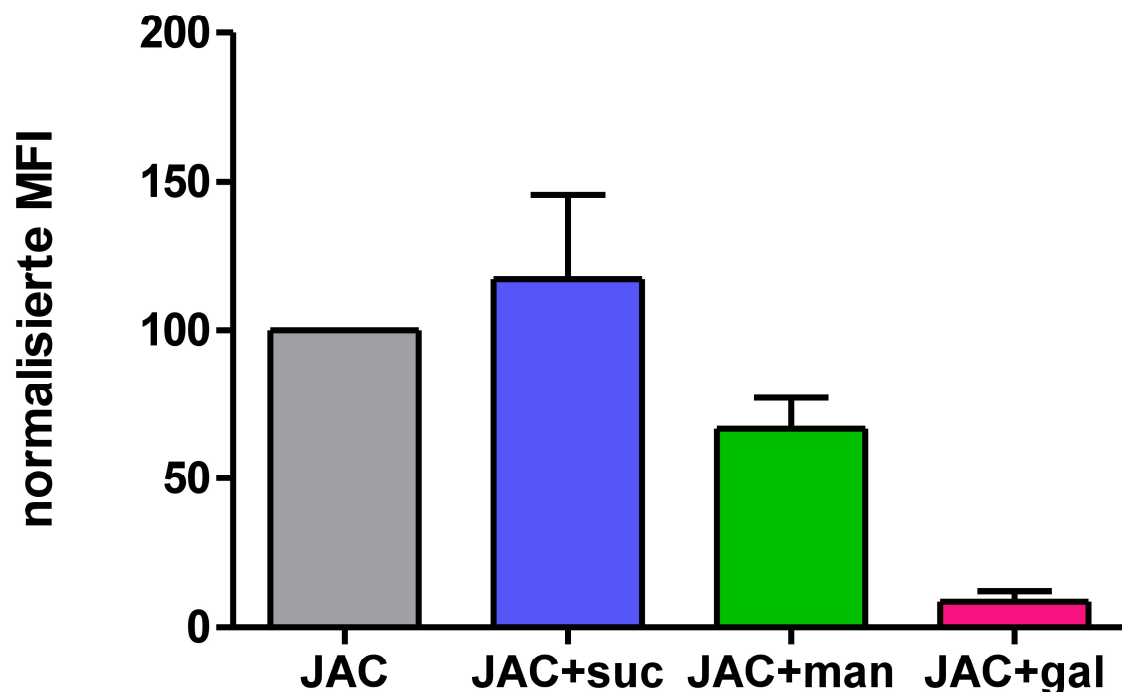


Abbildung 4.8 JAC-Inhibierung mit den Sacchariden Galaktose, Sukrose und Mannose. Nicht inhibiertes JAC ist in grau dargestellt. Das Balkendiagramm (links) und repräsentative

Überlagerungen der Histogramme (rechts) zeigen eine stark verminderte Bindung an equine Neutrophile nach der Inhibierung mit einer 20%igen Galaktoselösung. Die der Inhibierung mit einer 20%igen Mannoselösung zeigte eine leicht verminderte Bindung von JAC, während die Inhibierung mit einer 20%igen Sukroselösung keine Minderung der JAC-Bindung erwirkte. Die Balkendiagramme repräsentieren den Mittelwert der normalisierten MFI (siehe Kapitel 3.3.6) und die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

4.3 Immunzytologischer Nachweis der verringerten BanLec-bindenden und erhöhten JAC-bindenden Oberflächenglykane auf ERU-Neutrophilen

Durch die durchflusszytometrische Untersuchung der Oberflächenglykosylierung von Neutrophilen mithilfe von Pflanzenlektinen wurden signifikante Unterschiede zwischen gesunden und an ERU erkrankten Pferden festgestellt. Dabei waren Glykosyl- und Mannosyl-Reste, die von BanLec identifiziert wurden, bei Neutrophilen von an ERU erkrankten Pferden signifikant schwächer ausgeprägt (* $p = 0,0163$; Abbildung 4.3 A), während JAC-bindende O-Glykoside signifikant stärker abundant auf der Neutrophilen-Oberfläche von an ERU erkrankten Tieren waren (** $p = 0,0012$; Abbildung 4.1 B). Diese Unterschiede wurden nun mittels Immunzytochemie genauer untersucht. Zusätzlich zu den Färbungen mit BanLec und JAC, wurde eine Kontrollfärbung mit DBA angefertigt. Die Färbung mit DBA diente als Negativkontrolle, da DBA-gebundene Glykane in der Durchflusszytometrie nicht detektiert wurden (Abbildung 4.6 A). Dies konnte auch in der Immunzytochemie reproduziert werden (Abbildung 4.9 A) und verdeutlicht so nochmals das Fehlen von terminal gebundenen α -GalNAc. BanLec-bindende Strukturen waren auf der Oberfläche von ERU-Neutrophilen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant reduziert in der Immunzytochemie ($p = **** p < 0,0001$; Abbildung 4.9 B). Im Gegensatz dazu konnten auf der Zelloberfläche der Neutrophilen von an ERU erkrankten Pferden eine signifikant erhöhte Abundanz von JAC-bindenden O-Glykosiden festgestellt werden ($p = **** p < 0,0001$; Abbildung 4.9 C). Die präsentierten Immunfluoreszenzbilder verdeutlichten die Unterschiede auf zellulärer Ebene und stützten die krankheitsassoziierte Umverteilung von spezifischen Glykosylierungsmustern (Abbildung 4.9), die bereits mittels Durchflusszytometrie festgestellt wurde (siehe

Kapitel 4.1). Zusammengefasst wurde in einer quantitativen und einer qualitativen Methode nachgewiesen, dass die Oberflächenglykosylierung von Neutrophilen aus dem Blut von an ERU erkrankten Pferden verändert ist.

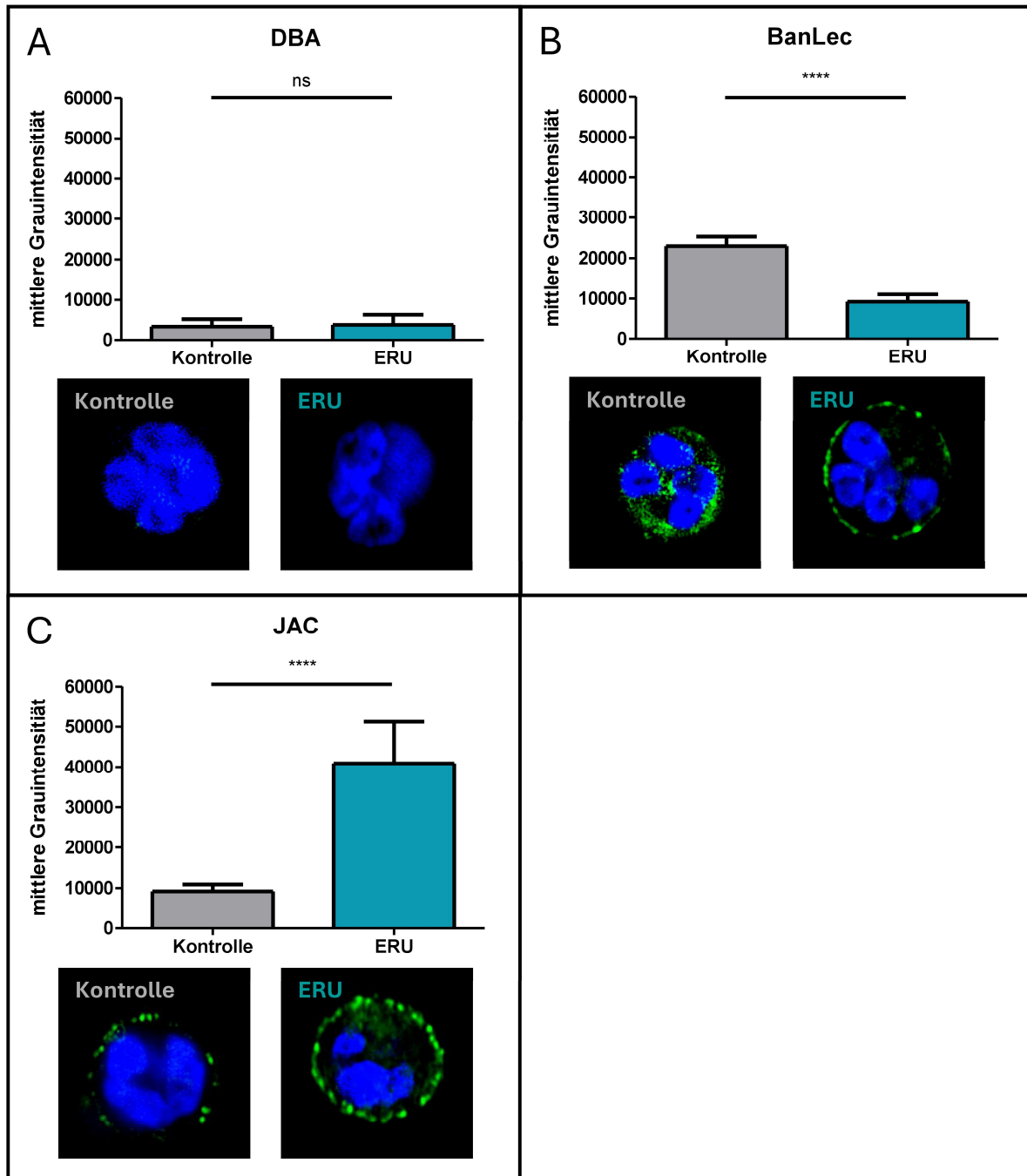


Abbildung 4.9 ERU-assoziierte Veränderungen der Glykosylierung der Neutrophilenoberfläche von gesunden und an ERU erkrankten Pferden. Die Immunzytochemie zeigt die Bindung der dargestellten Pflanzenlektine DBA (A), BanLec (B)

und JAC (C) an Glykanstrukturen der Zelloberfläche (grün). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Die Balkendiagramme zeigen die Quantifizierung der Pflanzenlektin-Glykan-Bindungs-Signalintensität der Kontroll- (grau; n = 30) und der an ERU erkrankten Pferden (blau; n = 30), gemessen mittels ImageJ. (A) DBA-bindende Glykane wurden weder in Kontroll- noch in an ERU erkrankten Pferden nachgewiesen. (B) BanLec-bindende Glykane waren auf Neutrophilen aus an ERU erkrankten Pferden signifikant vermindert. (**** $p < 0,0001$). (C) JAC-bindende Glykane waren auf der Oberfläche von Neutrophilen aus an ERU erkrankten Pferden signifikant erhöht (**** $p < 0,0001$).

4.4 Präzipitation von O-Glykanen mit Jacalin

Da ERU-assoziierte Unterschiede in der Oberflächenglykosylierung von equinen Neutrophilen festgestellt werden konnten, wurden diese Änderungen näher untersucht. Von besonderem Interesse war dabei die erhöhte Abundanz von JAC-bindenden O-Glykanen auf Neutrophilen von an ERU erkrankten Pferden. Ein vermehrtes Vorkommen von O-Glykanen im Zusammenhang mit Erkrankungen beim Pferd wurde bisher bei Osteoarthritis beschreiben, jedoch nicht auf Immunzellen sondern auf Synovialproteinen aus dem Karpus (NOORDWIJK et al., 2022). Bei Erkrankungen wie der ERU wurde eine erhöhte O-Glykosylierung auf der Oberfläche von equinen Neutrophilen bisher nicht beschrieben (Stand der PubMed-Recherche: 03.10.2025).

Um die erhöhte JAC-Bindung, die auf ERU-Neutrophilen nachgewiesen wurde, weiter zu charakterisieren, wurde über Nacht eine Präzipitation unter Verwendung von Agarose-gekoppelten JAC-Beads durchgeführt, um JAC-spezifische O-glykosylierte Proteine anzureichern. Nach der Präzipitation wurden die Proteine von den Beads eluiert und mittels SDS-PAGE in molekulargewichtsspezifische Banden aufgetrennt, um die Präzipitate in weiteren Untersuchungen näher zu charakterisieren.

4.4.1 Detektion JAC-assoziiertes O-glykosylierter Kandidatenproteine

Die SDS-PAGE-Analyse von Lysaten und Präzipitat-Überständen zeigte eine Vielzahl verschiedener Proteinbanden, wohingegen die SDS-PAGE der Eluate deutlich weniger Banden ergab, darunter eine Bande bei 90 - 100 kDa, die konsistent sowohl

ERGEBNISSE

bei den Eluaten aus den ERU-Proben als auch bei als den Kontrollen beobachtet wurde (Abbildung 4.10 A, schwarzer Rahmen). Diese Bande erschien in den Eluaten der ERU-Proben intensiver und die densitometrische Analyse bestätigte eine 1,4-fach höheres Signal in ERU-Neutrophilen, dass allerdings keine statistische Signifikanz erreichte (Abbildung 4.10 B). Bei den Überständen war diese Bande nicht und bei den Lysaten nur leicht detektierbar, was darauf hindeutet, dass die O-glykosylierten Proteine in dieser Bande mit JAC präzipitiert und somit in den Eluaten angereichert wurden. Weitere Banden auf der SDS-PAGE der Eluate sind nicht konstant in allen Reihen nachweisbar, so zeigte die ERU-Probe in der zweiten Reihe nur ein Bandensignal bei 90 – 100 kDa (Abbildung 4.10 A, links).

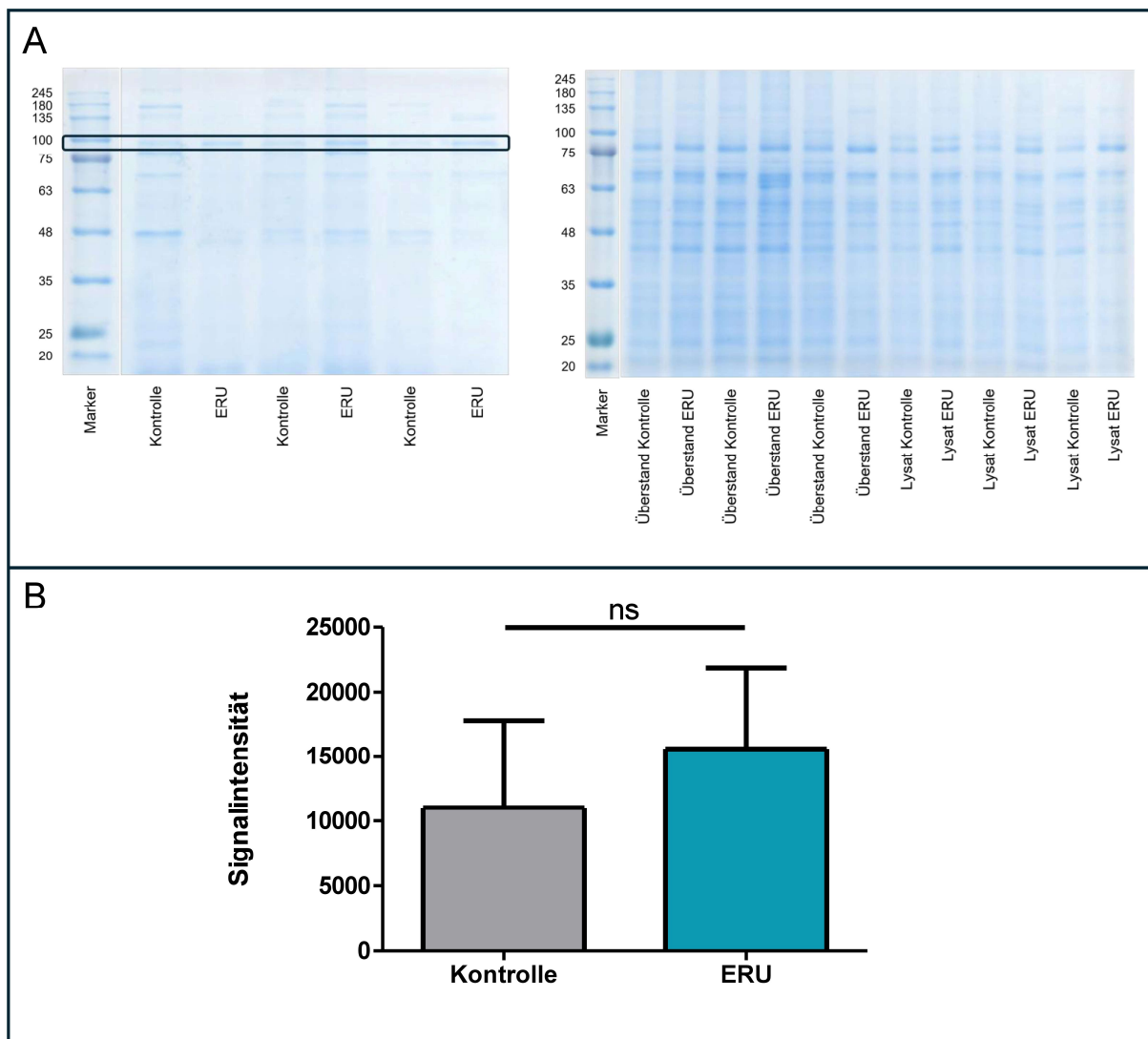


Abbildung 4.10 Proteine, die mittels JAC-Präzipitation angereichert wurden. (A) Repräsentatives 1D-SDS-Gel (10 %) mit Eluaten aus der JAC- Präzipitation (links) zeigt in

allen Proben bei 90 - 100 kDa eine deutliche Bande (grau umrahmt), was auf das Molekulargewicht von O-glykosylierten Proteinen aus der JAC- Präzipitation, die von JAC in equinen Neutrophilen gebunden werden, hinweist. Repräsentatives 1D-SDS-Gel (10%), das mit Überständen aus der JAC-Präzipitation und Lysaten durchgeführt wurde (rechts), zeigt keine oder schwache Banden bei 90 – 100 kDa. (B) Quantifizierung der Intensität der detektierten Bande in Eluaten der Kontrollen (grau; n = 3) und ERU-Proben (blau; n = 3). Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt. Die Bandenintensität in ERU war 1,4-fach höher als in Kontrollen, allerdings nicht signifikant (ns $p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

4.4.2 Berechnung des exakten molekularen Gewichts der unbekannt Proteine

Um einen besseren Aufschluss über Glykoproteine zu erhalten, die in ERU entweder höher abundant vorkommen oder in gleicher Menge auf der Neutrophilenoberfläche vorliegen, jedoch stärker O-glykosyliert sind, wurde das exakte molekulare Gewicht der zwischen 90 – 100 kDa schweren Proteine, die durch JAC präzipitiert wurden, rechnerisch bestimmt (siehe Kapitel 3.5.6.3). Dies ergab sich ein molekulares Gewicht von 94,5 kDa für mögliche Kandidatenproteine (Abbildung 4.11; roter Punkt).

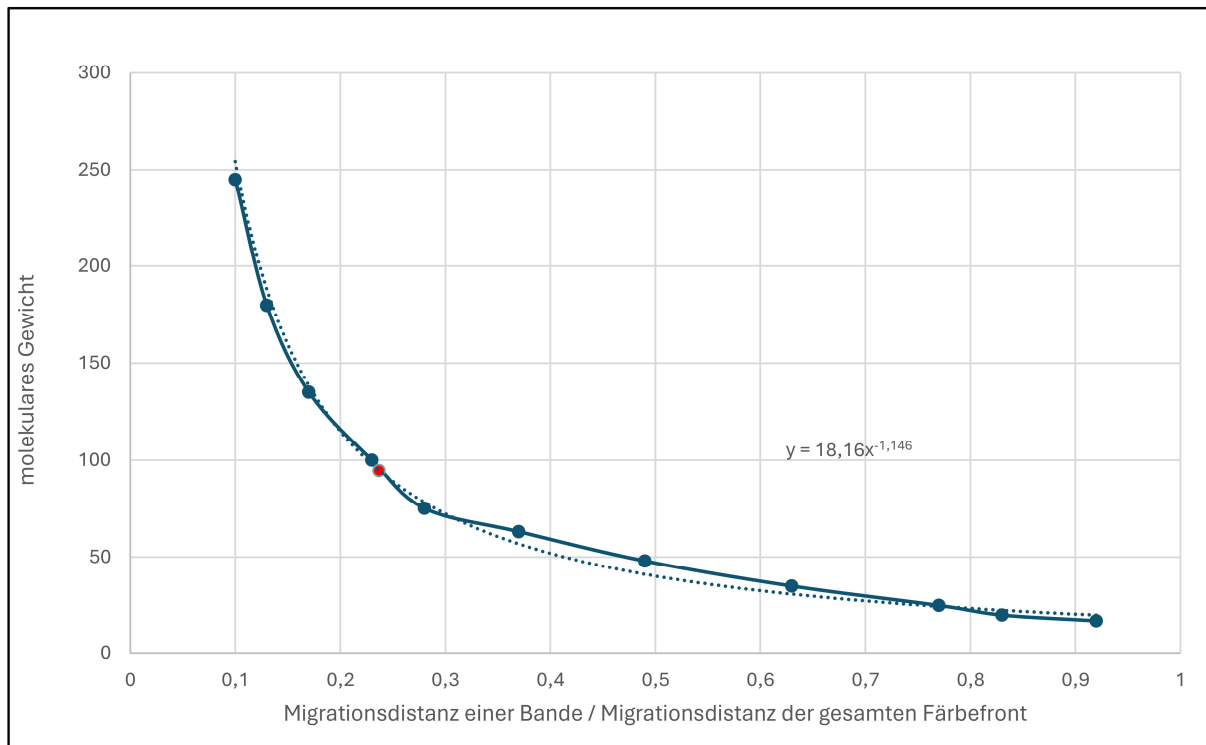


Abbildung 4.11 Graph zur Berechnung des molekularen Gewichts von unbekanntem Banden. Dargestellt ist der Graph, der durch Ausmessung der Migrationsdistanz der Markerbanden eines Proteinbandenmarkers entsteht. Der in diesem Fall zu ermittelnde Punkt ist in rot dargestellt und entspricht einem molekularen Gewicht von 94,5 kDa.

4.5 Identifikation möglicher Kandidatenproteine für O-Glykosylierung anhand des Proteoms der Neutrophilen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden

Durch die Ergebnisse der Jacalin-Präzipitation konnte eine Anreicherung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 94,5 kDa festgestellt werden, die zudem in den ERU-Proben leicht erhöhte Abundanz zeigten. Um nun zu evaluieren, welche Glykoproteine für diese gesteigerte O-Glykosylierung in Betracht gezogen werden können, wurde das Proteom von equinen Neutrophilen nach möglichen Kandidatenproteinen durchsucht. Hierfür wurde ein Datensatz verwendet, der vergleichend das Gesamtproteom von Neutrophilen gesunder und an ERU erkrankter Pferde zeigt (WEIGAND et al., 2021). In dieser Proteomauswertung konnten insgesamt 2362 Proteine identifiziert werden. Von diesen 2362 Proteinen, waren 212

Proteine in den Neutrophilen der an ERU erkrankten Pferde höher abundant.

4.5.1 Auswertung eines Datensatzes des neutrophilen Proteoms nach festgelegten Kriterien

Um zu klären, ob diese Bande mit Proteinen korrespondieren könnte, deren Gesamtvorkommen in ERU-Neutrophilen erhöht ist, suchten wir in zuvor veröffentlichten Proteomdaten nach Kandidatenproteinen. Da in den JAC-Eluaten eine konstante Bande bei 94,5 kDa detektiert wurde (siehe Kapitel 4.4), die bei den Eluaten aus den ERU-Proben 1,4-fach stärker ausgeprägt war als bei den Kontrollen und zudem im Pflanzenlektin-Screening ein mehr als zweifacher Anstieg von JAC-bindenden Glykanen bei den ERU-Neutrophilen nachweisbar war, wurde der Neutrophilen-Proteom-Datensatz nach folgenden Kriterien gefiltert: Das Molekulargewicht des gesuchten Proteins wurde auf 90 – 100 kDa eingegrenzt und der Abundanz-Unterschied zwischen ERU und Kontrolle wurde von 1,1 bis 2,2 festgelegt. Des Weiteren mussten die in Frage kommenden Proteine in allen gemessenen Proben (n = 6) detektiert worden sein, da in der Durchflusszytometrie und der Immunzytometrie in jeder Probe JAC-bindende Glykane festgestellt wurden (siehe Kapitel 4.1. und 4.3). Zudem wurde die Suche auf Proteine, die an der Zelloberfläche vorkommen, beschränkt. Als letztes Kriterium wurde überprüft, ob für die verbliebenden Proteine eine O-Glykosylierung wahrscheinlich ist. Dafür wurde NetOGlyc 4.0 (STEENTOFT et al., 2013) zur Berechnung von O-Glykosylierungen verwendet (siehe Kapitel 3.6.2).

4.5.2 CDCP1 und ITGB2 sind mögliche Kandidatenproteine mit erhöhter Abundanz und verstärkter O-Glykosylierung in ERU

Nach Anwendung der von uns festgelegten Kriterien, standen fünf Proteine in der engeren Auswahl. Diese waren das CUB-Domäne-enthaltendes Protein 1 (*engl.* CUB Domain Containing Protein 1, CDCP1), Integrin, Beta 2 (ITGB2), Adhesion G Protein-coupled Receptor E5 (ADRE5), Oxysterol Binding Protein-Like 8 (OSBPL8) und die Glukosidase alpha (GANAB) (Tabelle 4.2). Bei der Berechnung der O-

ERGEBNISSE

Glykosylierungen dieser Proteine (siehe Kapitel 3.6.2), wurde bei GANAB nur eine potenzielle O-Glykosylierungsstelle mit einer Wahrscheinlichkeit von 51,1% gefunden. Das Protein GANAB wurde aufgrund dieses Befundes ausgeschlossen. Nach genauer Analyse der Eigenschaften der fünf vorgestellten Proteinen erschienen CDCP1 und ITGB2 als geeignete Kandidaten, aufgrund ihres molekularen Gewichts nahe der 94,5 kDa und ihrer ungefähr zweifach erhöhten Abundanz in ERU, die dem Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse von JAC-bindenden O-Glykanen entspricht (siehe Kapitel 4.1.1).

Protein ^a	Genname ^b	Accession Nummer ^c	Ratio Kontrolle/ERU ^d	Molekulares Gewicht ^e
CUB Domain Containing Protein 1	CDCP1	ENSECAP00000022716	2,2	93,0
Integrin, Beta 2	ITGB2	ENSECAP00000021220	1,9	94,8
Adhesion G Protein- Coupled Receptor E5	ADGRE5	ENSECAP00000008739	1,4	93,1
Oxysterol Binding Protein-Like 8	OSBPL8	ENSECAP00000013659	1,1	95,6
Glucosidase, alpha	GANAB	ENSECAP00000012762	1,1	96,3

Tabelle 4.2 Ausgewählte Proteine nach der Festlegung ausgewählter Kriterien. Proteine von Kontroll- und ERU-Neutrophilen, die in allen Proben (6 von 6) zuvor veröffentlichter Proteomdaten identifiziert wurden, gefiltert nach einem Molekulargewicht zwischen 90 und 100 kDa und höherer Abundanz ($\geq 1,1$) in ERU im Vergleich zu Kontrollen. Alle aufgeführten Proteine befinden sich auf der Zelloberfläche. Geeignete Kandidaten sind fett markiert. (a) Name des Proteins. (b) Name des entsprechenden Gens. (c) Protein-Zugangsnummer gemäß der Ensembl-Pferdedatenbank (Version 75, www.ensembl.org). (d) Verhältnis der Unterschiede in der Proteinabundanz bei ERU-Fällen im Vergleich zu Kontrollen. (e) Molekulargewicht der aufgeführten Proteine gemäß der Uniprot-Datenbank (<https://www.uniprot.org>, aufgerufen am: 01.09.2025).

4.5.3 Immunzytologischer Nachweis des ITGB2 (CD18) und Kolokalisation von JAC

Immunzytologisch wurde nachgewiesen, dass ITGB2 sowohl auf Neutrophilen gesunder (Abbildung 4.12 C) als auch denen, von an ERU erkrankten Pferden vorhanden ist (Abbildung 4.12 G). Auf den Neutrophilen der an ERU erkrankten Pferde waren JAC als auch ITGB2 auf der Oberfläche der Zellen höher abundant (Abbildung 4.12 F, G). In der Überlagerung der Fluoreszenzfärbungen von JAC und ITGB2 konnte eine Kolokalisation gezeigt werden (Abbildung 4.12 H).

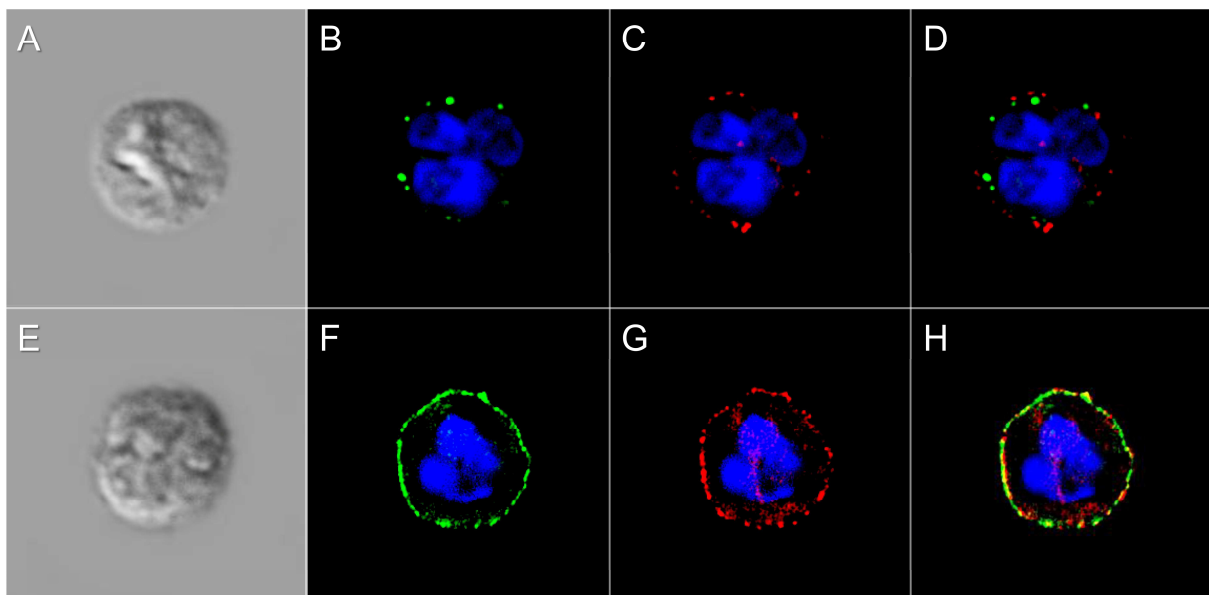


Abbildung 4.12 JAC- und ITGB2-Bindung auf der Oberfläche von Neutrophilen aus gesunden und an ERU erkrankten Pferden. Die Immunzytochemie zeigt die Bindung von JAC (grün) und ITGB2 (rot) als Hinweis auf die O-Glykosylierung von ITGB2 auf der Oberfläche von Neutrophilen aus gesunden (A–D) und an ERU erkrankten Pferden (E–H). (A, E) DIC-Bild, (B, F) JAC-Bindung (grün), (C, G) ITGB2-Bindung (rot), (D, H). Überlagerung der JAC- und ITGB2-Bindung zeigt Kolokalisierung (gelb). JAC und ITGB2 zeigen eine erhöhte Bindung an Neutrophile aus an ERU erkrankten Pferden (D-F) im Vergleich zu Kontrollen (A-C). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

5 DISKUSSION

Die ERU ist tiermedizinisch hochrelevant, da diese weltweit auftretende autoimmun-medierte Erkrankung einer der häufigsten Ursachen der Erblindung beim Pferd ist (GILGER et al., 2022). Obwohl die ERU als T-zell-vermittelte Krankheit gilt, konnte in vielen Untersuchungen auch die Beteiligung von Neutrophilen nachgewiesen werden (DEEG et al., 2001; FINGERHUT et al., 2019; DEGROOTE und DEEG, 2020; WEIGAND et al., 2021; FINGERHUT et al., 2022; HOFFMANN et al., 2022). Neutrophile Granulozyten sind Zellen der schnell reagierenden, angeborenen Immunantwort und damit die ersten Effektorzellen, die bei einer Entzündungsreaktion ins Gewebe migrieren (KOLACZKOWSKA und KUBES, 2013; LEBLANC et al., 2024). In der ERU ist der Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke ein ausschlaggebendes Ereignis, das den Influx von Immunzellen, wie autoreaktiven T-Zellen und Neutrophilen ermöglicht (DEEG et al., 2007b; UHL et al., 2014; DEGROOTE und DEEG, 2020). Wie genau es zum Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke kommt und ob dies bei der ERU ein initial auftretender Prozess ist, der anschließend die Migration peripherer Immunzellen in das Auge erleichtert, oder als sekundärer Effekt infolge der Rekrutierung von autoreaktiven Leukozyten aus der Peripherie entsteht, ist dabei nicht vollständig geklärt (DEGROOTE und DEEG, 2020). Allerdings wird vermutet, dass auch hierbei Neutrophile durch die Bildung von cytotoxischen NETs beteiligt sein könnten (FINGERHUT et al., 2022). Des Weiteren wurde in einer Reihe von Proteomanalysen festgestellt, dass Neutrophile aus an ERU erkrankten Pferden ein verändertes Proteom aufweisen und sich zudem in einem präaktivierten Zustand gegenüber den Zellen aus gesunden Pferden befinden (WEIGAND et al., 2021; HOFFMANN et al., 2022; DEGROOTE et al., 2023). Veränderungen des Proteoms und der Glykosylierung von neutrophilen Proteinen sind eng miteinander verbunden, da die Glykosylierung von Proteinen nicht nur die häufigste Form der PTM ist, sondern auch deren Funktion maßgeblich beeinflusst (SCHJOLDAGER et al., 2020; HE et al., 2024). Besonders interessant ist dabei die Oberflächenglykosylierung, da sie an vielen biologischen Prozessen wie der Zelladhäsion oder der Signaltransduktion beteiligt ist (HE et al., 2024) (siehe Kapitel 2.2.2). Zu momentanen Zeitpunkt ist die Oberflächenglykosylierung von equinen Neutrophilen nur unzureichend erforscht (Stand der PubMed-Recherche: 09.09.2025). Daher war es das erste Ziel dieser Arbeit die Oberflächenglykosylierung von Neutrophilen aus gesunden und an ERU

erkrankten Pferden näher zu charakterisieren, um einen Überblick über die Glykanlandschaft auf der Oberfläche von equinen Neutrophilen zu gewinnen und mögliche krankheitsspezifische Veränderungen der Glykosylierung korrekt einordnen zu können.

Neutrophile sind wichtige Zellen des angeborenen Immunsystems mit einer Vielzahl von Effektorfunktionen und sind damit an vielen Autoimmunkrankheiten beteiligt (UGONOTTI et al., 2021). Der Aktivierungsstatus der Neutrophilen kann sich in der Proteinstruktur der Zelloberfläche widerspiegeln und kann durch Veränderungen der Häufigkeit bestimmter Proteine sowie durch PTM von Oberflächenproteinen dargestellt werden (HE et al., 2024). Eine der entscheidenden PTM während der Zellaktivierung ist die Glykosylierung, die die Immunantwort durch ihren Einfluss auf Zell-Zell-Interaktionen wie die Antigenpräsentation und die Modifikation der Signaltransduktion beeinflussen kann (VAN KOOYK und RABINOVICH, 2008; WOLFERT und BOONS, 2013). Die Oberflächenglykosylierung von Neutrophilen wurde bereits für bestimmte Proteine (YAGO et al., 2010), für einzelne Glykane (VENKATAKRISHNAN et al., 2020) oder im Zusammenhang mit bestimmten Krankheiten beschrieben (UGONOTTI et al., 2021). Beispielsweise ist für menschliche Neutrophile ausführlich beschrieben, dass der Toll-like-Rezeptor 4, welcher zu einer der wichtigsten Zellrezeptorfamilien des angeborenen Immunsystems gehört, mehrere N-Glykosylierungsstellen aufweist (DA SILVA CORREIA und ULEVITCH, 2002; OHNISHI et al., 2003). Beim Menschen konnte zudem das Glykom isolierter Neutrophilen und deren verschiedener Organellen beschrieben werden (VENKATAKRISHNAN et al., 2020; KAWAHARA et al., 2023). Intrazytoplasmatisch in Neutrophilen vorkommende Granula und Vesikel enthalten eine große Menge stark glykosylierter Proteine. Sobald Neutrophile aktiviert sind, wie dies auch in der ERU gezeigt wurde (WEIGAND et al., 2021; HOFFMANN et al., 2022), können sie diese intrazellulär gespeicherten Glykoproteine auf der Zelloberfläche exprimieren, um ihre Immunantwort zu modulieren. Bemerkenswert ist, dass die Proteinbiosynthese in Neutrophilen gering ist, was bedeutet, dass der Großteil der Glykoproteine von Neutrophilen bereits in der Zelle vorhanden ist und im Verlauf der Aktivierung an die Zelloberfläche verlagert werden (HUGHES et al., 1987). Die Erforschung der Glykosylierung der Neutrophilenoberfläche, unabhängig von spezifischen Proteinen, Glykanresten oder Krankheiten, ist bislang unzureichend erforscht, insbesondere in Großtiermodellen (Stand der PubMed-Recherche:

21.09.2025). Daher wurde in der hier vorliegenden Studie die Zelloberfläche von Neutrophilen von Pferden auf das Vorhandensein einer Vielzahl verschiedener Glykane untersucht, um eine erste umfassende Beschreibung des Oberflächenglykoms für Neutrophile von Pferden zu generieren. Angesichts der Tatsache, dass Säugetiere eine immense Vielfalt an Oberflächenglykanen exprimieren (SCHJOLDAGER et al., 2020), liefert diese Studie einen wertvollen ersten Überblick über das Glykom der Neutrophilenoberfläche von Pferden, basierend auf den Bindungsspezifitäten der 35 genutzten Pflanzenlektine, und unterstreicht dabei die Heterogenität der Oberflächenglykosylierung auf diesen Zellen. Diese wichtigen Aspekte des Glykanprofils der Neutrophilenoberfläche in ihrem „gesunden“ Zustand wurden beim Pferd bisher noch nicht beschrieben und ist als Grundlage für weiterführende Untersuchungen zur Zusammensetzung der an der Oberfläche exponierten Glykananteile auf Neutrophilen nützlich. Im Zuge dessen können alle Oberflächenglykane, die in Neutrophilen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden nicht signifikant unterschiedlich vorkommen, zusammengefasst werden und als Beschreibung der grundsätzlichen Oberflächenglykosylierung von equinen Neutrophilen angesehen werden.

Dabei konnten erstmals Core 1, 2 und 3 O-Glykane (PNA, JAC, ACL, ABL) sowie α 2,3-sialylierte O-Glykane (MAL-2) auf equinen Neutrophilen nachgewiesen werden und dienen damit der näheren Charakterisierung des O-Glykans dieser Zellen (Tabelle 4.1; Abbildung 4.1). Neben diesen O-Glykanstrukturen konnten auch bisectierte GlcNAc-Strukturen detektiert werden. Darunter versteht man N-Glykane, bei denen an die zentrale Mannose über eine β 1,4-Bindung ein GlcNAc gebunden ist (BOJAR et al., 2022). Diese Strukturen wurde vom Pflanzenlektin PHA-E detektiert, das eine verstärkte Affinität zu Typ 2 LacNAc-Strukturen in einem bisectierten GlcNAc zeigt und damit auf das Vorliegen von LacNAc-Strukturen im equinen Neutrophilenglykom hinweist (Tabelle 4.1; Abbildung 4.2). Als Typ 2 LacNAc bezeichnet man dabei Gal β 1,4GlcNAc-Strukturen, wohingegen Typ 1 LacNAc eine β 1,3-Bindung aufweisen (FISCHODER et al., 2017). Darüber hinaus wurden an dem terminalen Ende der Glykanstrukturen auf der Oberfläche von Neutrophilen gesunder und an ERU erkrankter Pferde sowohl α - als auch β -gebundene Galaktosen beziehungsweise GalNAc-Strukturen detektiert (ABL, BPL, DSL, ECL, GSL I, GSL-I-B4, LEL, PHA-E, PHA-L, RCA, S-WGA, WFA, WGA) (Tabelle 4.2; Abbildung 4.2; Abbildung 4.5;

Abbildung 4.6; Abbildung 4.7). Da eine terminale Typ 2 LacNAc-Struktur ebenfalls mit einer β -Galaktose endet und ebenfalls durch die Bindung von Pflanzenlektinen (ECL) nachgewiesen wurde, wurde gezeigt, dass diese Struktur auch als terminale Verbindung auf den equinen Neutrophilen vorkommt (Tabelle 4.1, Abbildung 4.5). Zudem wiesen viele der eingesetzten Pflanzenlektine, mit denen Glykanstrukturen auf den equinen Neutrophilen nachgewiesen wurden, eine Präferenz für LacNAc-Strukturen auf, die häufig terminal entweder ein LacNAc-Motiv, mehrere LacNAc-Wiederholungen oder unterschiedliche weitere Strukturen wie β -Galaktose, α 1,2-gebundene Fukose oder GlcNAc terminal an der LacNAc-Struktur tolerierten (AAL, ABL, DSL, LEL, PHA-E, WFA) (Tabelle 4.1; Abbildung 4.2; Abbildung 4.3; Abbildung 4.5; Abbildung 4.6). Im Einklang damit konnten ebenfalls α 2,6-sialylierte LacNAc-Strukturen auf den equinen Neutrophilen nachgewiesen werden (SNA) (Tabelle 4.1; Abbildung 4.7). Des Weiteren wurden α 1,3- und α 1,6-Mannosylstrukturen sowie weitere terminale α -Mannosylstrukturen auf der Oberfläche von equinen Neutrophilen detektiert (Abbildung 4.3). Interessant ist dabei, dass terminale α -Mannosylstrukturen in einer Trisaccharidstruktur, die eigentlich vom Pflanzenlektin HHL gebunden werden sollten, mithilfe dieses Lektins kaum auf der equinen Neutrophilenoberfläche nachgewiesen werden konnte (Tabelle 4.1; Abbildung 4.3), während α 1,3- und α 1,6-Mannosylstrukturen (GNL, NPL) in höherer Abundanz dazu festgestellt wurden (Tabelle 4.1; Abbildung 4.3).

Viele dieser O- und N-Glykanstrukturen, sowie Mannosylstrukturen wurden ebenfalls bei humanen Neutrophilen durch die massenspektrometrischen Untersuchung einer Fraktion, die sekretorischen Vesikel und der Plasmamembrananteile umfasst, nachgewiesen (VENKATAKRISHNAN et al., 2020). In den sekretorischen Vesikeln ist ein großer Teil der Membranproteine enthalten, die nach Stimulation der Neutrophilen zügig auf die Zelloberfläche verlagert werden (COWLAND und BORREGAARD, 2016). Damit gibt der Inhalt der sekretorischen Vesikel darüber einen Einblick, wie sich die Oberflächenglykosylierung bei Aktivierung der Neutrophilen zum Beispiel bei einer Entzündungsreaktion verändern könnte. Detaillierter betrachtet wurden auch auf humanen Neutrophilen Core 1 und Core 2 O-Glykanstrukturen, sowie Sialinsäure in α 2,3-Bindung an ein O-Glykan in dieser Fraktion der humanen Neutrophilen detektiert (VENKATAKRISHNAN et al., 2020). Darüber hinaus sind in dieser Fraktion, die aus humanen Neutrophilen isoliert wurde, vor allem die verzweigten N-Glykane mit

mehreren LacNAc-Wiederholungen abundant (VENKATAKRISHNAN et al., 2020). Ebenso konnten Pauci- und Oligomannose-Glykane, die terminal eine α 1,2-, α 1,3- und α 1,6-gebundene Mannose tragen, in der Fraktion der Plasmamembran und den sekretorischen Vesikeln gefunden werden (VENKATAKRISHNAN et al., 2020) und damit Strukturen, die auch auf der Oberfläche von equinen Neutrophilen nachgewiesen wurden. Unter Paucimannosylierung versteht man dabei das Vorliegen vergleichsweise kurzer N-Glykane, die aus zwei β -verknüpften GlcNAc mit einer Verlängerung von bis zu drei Mannoseresten und einer Core Fukose bestehen (WUHRER, 2019). Im Vergleich zu den humanen Neutrophilen, konnte somit festgestellt werden, dass hierbei durchaus einige Gemeinsamkeiten in der Oberflächenglykosylierung zu finden sind. Es sollte jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass in der Analyse des humanen Glykoms eine Fraktion aus der Plasmamembran und den sekretorischen Vesikeln untersucht wurde, während auf den equinen Neutrophilen nur die Oberflächenglykane untersucht wurden.

Des Weiteren legen diese Befunde nahe, dass viele der Glykanstrukturen, die auf der Neutrophilenoberfläche von gesunden und an ERU erkrankten Pferden detektiert wurden, Strukturen entsprechen, die auch von körpereigenen Lektinen erkannt werden könnten. Diese körpereigenen Glykan-bindende Lektine werden in drei Klassen eingeteilt, die jeweils unterschiedliche Bindungsspezifitäten haben: Galektine, C-Typ Lektine und Sialinsäure-bindende Immunglobulin-ähnliche Lektine (Siglecs) (PINHO et al., 2023). Die Galektine binden spezifisch an Glykanstrukturen, die LacNAc enthalten und ebenso an Core 2 O-Glykane (PINHO et al., 2023). Beide Glykanstrukturen konnten auch auf equinen Neutrophilen nachgewiesen werden und bieten damit ein Bindungspartner für Galektine auf der Oberfläche der Zellen (Tabelle 4.1). Im adaptiven wie im angeborenen Immunsystem haben Galektine eine immunmodulierende Funktion, die vor allem in autoimmunen Erkrankungen deutlich geworden ist (RABINOVICH und TOSCANO, 2009). Beispielsweise wurde Galektin-3 in einem murinen EAU-Modell aufgrund seiner signifikant erhöhten Abundanz auf der Retina von EAU-Mäusen und der damit verbundenen Aktivierung eines TLR4-abhängigen Stoffwechselweg eine proinflammatorische Funktion in der EAU zugesprochen (LIU et al., 2022). Das klinische und histologische Bild der EAU war zudem deutlich verbessert bei EAU-Mäusen, die mit einer intravitreale Injektion von TD139, einem Galektin-3 Inhibitor, behandelt wurden (LIU et al., 2022). Im Gegensatz

dazu hatte eine Behandlung von EAU-Mäusen mit Galektin-8 eine antiinflammatorische Wirkung (SAMPSON et al., 2015). Die Behandlung mit Galektin-8 erhöhte dabei die Expression von regulatorischen T-Zellen, die unter anderem immunosuppressive Zytokine produzieren (SAMPSON et al., 2015). Dies verdeutlicht die Bedeutung von Galektinen in der Regulation von immunologischen Prozessen. Inwiefern die auf der Oberfläche von equinen Neutrophilen detektierten Poly-LacNAc-Strukturen allerdings wirklich Bindungsstellen für Galektine entsprechen, kann nicht abschließend geklärt werden und sollte weiterführend untersucht werden. Allerdings konnte an equinen mesenchymalen Stromazellen gezeigt werden, dass equines Galektin 1 und 3 durch eine Inhibierung mit β -Laktose in ihrer Bindung gehemmt werden können, was im Folgeschluss sehr hinweisend darauf ist, dass equines Galektin 1 und 3 an Laktose-haltige Strukturen und wie beispielsweise Poly-LacNAc-Strukturen binden (REESINK et al., 2017). C-Typ Lektine binden vorwiegend an Mannose-haltige Strukturen, jedoch konnte bei humanen Makrophagen nachgewiesen werden, dass Makrophagen Galaktose-Typ Lektine, eine Untergruppe der C-Typ Lektine, auch an terminale α - und β -GalNAc binden (VAN VLIET et al., 2008), die wie auch terminale α -Mannosestrukturen auf equinen Neutrophilen detektiert wurden und somit mögliche Liganden für C-Typ Lektine beim Pferd darstellen könnten. Mannose-bindende Lektine gehören als Opsonine zum angeborenen Immunsystem und konnten auch zudem beim Pferd identifiziert werden (PODOLSKY et al., 2006). Klinisch erkrankte Tiere zeigten dabei deutlich geringere MBL-Konzentrationen im Serum, was mit einer verringerten MBL-abhängigen Komplementaktivierung assoziiert war (PODOLSKY et al., 2006).

Siglecs sind Sialinsäure bindende Lektine, die unter anderem α 2-3- und α 2-6-sialylierten Strukturen binden können (GONZALEZ-GIL und SCHNAAR, 2021), welche in unseren Experimenten auf equinen Neutrophilen über die Bindung der Pflanzenlektine MAL-2 und SNA nachgewiesen wurden (siehe Kapitel 4.1.1 und 4.1.7). Siglecs sind auf Immunzellen zu finden und ermöglichen es der Zelle körpereigene von körperfremden Epitopen zu unterscheiden und können so die Immunzellfunktion durch Siglec-abhängige Interaktionen regulieren (MACAULEY et al., 2014).

Auf der Oberfläche der Neutrophilen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden konnten α -Fukosestrukturen (AAL) insbesondere Core Fukosestrukturen (LCA, PSA) identifiziert werden (Tabelle 4.1; Abbildung 4.4). Davon ausgenommen waren

Strukturen, die α 1,3-Fukosestrukturen (LTL) enthalten. Diese Strukturen konnten nicht auf der equinen Neutrophilenoberfläche identifiziert werden (Tabelle 4.1; Abbildung 4.4.). Core Fukosylierungen sind eine Art der N-Glykosylierungen, die im Menschen durch die Fukosyltransferase 8 katalysiert wird, wobei Fukose über eine α 1,6-Bindung an ein N-Glykan gebunden wurde (SUN et al., 2022). Es konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Core Fukosylierung auf equinen Neutrophilen aus gesunden verglichen mit an ERU erkrankten Pferden festgestellt werden (Tabelle 4.1; Abbildung 4.4). In humanen Neutrophilen ist eine Core Fukosylierung ebenfalls in einer Fraktion von sekretorischen Vesikeln und der Plasmamembran nachgewiesen worden und damit vermutlich auch auf der humanen Neutrophilenoberfläche vertreten (VENKATAKRISHNAN et al., 2020; KAWAHARA et al., 2023). Bislang konnte allerdings nur ein Nachweis erbracht werden, dass eine aberrante Core Fukosylierung auf der Oberfläche von Lymphozyten an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beteiligt sind, für Neutrophile liegen entsprechende Untersuchungen bisher nicht vor (Stand der PubMed-Recherche: 10.09.2025). Allerdings zeigten sich bei anderen autoimmun-medierten humanen Erkrankungen in T-, B- und NK-Zellen spezifische Unterschiede in der Abundanz von Core Fukosylierungen auf der Zelloberfläche (MOREL et al., 2022; SZABO et al., 2024). Beispielsweise exprimieren aktivierte T-Zellen von Patienten mit SLE eine signifikant erhöhte Core Fukosylierung auf ihrer Zelloberfläche, während in einer anderen Studie eine signifikant geringere Abundanz der Core Fukosylierung auf B-Zellen von SLE-Patienten nachgewiesen wurde (MOREL et al., 2022), was darauf hindeutet, dass bestimmte Glykanveränderungen spezifisch vom untersuchten Zelltyp und der Erkrankung abhängen (SZABO et al., 2024).

Im Gegensatz zu den bereits auf der Oberfläche von gesunden und an ERU erkrankten Pferden festgestellten Glykanstrukturen, gab es auch einige Strukturen, die über die Bindung von spezifischen Pflanzenlektinen nicht nachgewiesen werden konnten. Dazu zählten interne Typ 2 LacNAc-Strukturen in linear angeordneten Glykanen, sowie Chitin-Oligomere (STL) (Tabelle 4.1; Abbildung 4.5). Außerdem wurden über diesen Ansatz auch keine α 1,3-gebundene Fukose-Oligosaccharidstrukturen nachgewiesen (LTL) (Tabelle 4.1; Abbildung 4.4), wie auch Kohlenhydratstrukturen, die α 1,3-gebundene Galaktose oder β 1,4-gebundene Galaktose and α 1,2-gebundene Fukose enthalten (PTL) (Tabelle 4.1; Abbildung 4.4). Diese Strukturen wurden beispielsweise

auf humanen Erythrozyten als Blutgruppenantigen detektiert (HOSOI, 2008). Des Weiteren befinden sich auf equine Neutrophilen auch keine terminale GalNac- α 1,3-GalNac-Strukturen, die auch als Forssmann-Antigen bezeichnet werden (DBA) (Tabelle 4.1; Abbildung 4.6).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die meisten Glykananteile, die auf der Oberfläche von Neutrophilen gesunder Pferde nachgewiesen wurden, in Neutrophilen von an ERU erkrankten Pferden ähnlich häufig vorhanden waren und dass einige der in dieser Studie verwendeten Pflanzenlektine, darunter HHL, LTL, PSA, PTL, UEA-1, SJA, STL, DBA, SBA, VVA und GSL II wie DBA, eine schwache, bis keine Bindung an Glykane auf der Oberfläche von equinen Neutrophilen demonstrierten (Tabelle 4.1; Abbildung 4.3; Abbildung 4.4; Abbildung 4.5; Abbildung 4.6; Abbildung 4.7). Dies deutet darauf hin, dass diese Oberflächenglykane möglicherweise nicht Teil des Glykoms auf der Oberfläche von equinen Neutrophilen sind oder nicht für die Lektinbindung zur Verfügung stehen. Um festzustellen, ob dies tatsächlich auf das Fehlen dieser Glykosylierungen zurückzuführen ist, oder ob diese Glykane eventuell in einer schlecht zugänglichen Form vorliegen, was eine Bindung des Pflanzenlektins beschränken oder sogar verhindern könnte (VARKI, 2017), können weitere Analysen unter verschiedenen Versuchsbedingungen durchgeführt werden, die bestimmen, wie die Glykanbindungsstellen präsentiert werden (ANDRE et al., 2016).

Die Verwendung von Pflanzenlektinen zur Charakterisierung von Oberflächenglykosylierungen ist eine einfache, schnelle Variante der Identifizierung von Glykanen. Dennoch hat diese Methodik Limitationen: Das benutzte Repertoire von 35 Pflanzenlektinen deckte zwar ein weites Feld von Glykanen ab, die auf der equinen Neutrophilenoberfläche vorkommen, allerdings ist es teilweise schwierig eine genaue Aussage über eine gesamte Glykanstruktur zu treffen, da oft nur terminale Anteile dieser Strukturen von Pflanzenlektinen gebunden werden können (BOJAR et al., 2022). Dies kann dazu führen, dass Glykane nicht erkannt werden, wenn ihre terminalen Anteile nicht für eine Bindung zur Verfügung stehen, obwohl sie eigentlich auf der Zelloberfläche präsent wären. Außerdem konnten Strukturen, die keiner der Spezifitäten der ausgewählten Pflanzenlektine entsprachen, nicht ermittelt werden. Mit der Charakterisierung der equinen Neutrophilenoberfläche durch Pflanzenlektine konnte dennoch ein solides Grundlagenwissen geschaffen werden, das nun durch

weitere, präzisere Verfahren wie der massenspektrometrischen Analyse der Oberflächenglykosylierung auf equinen Neutrophilen ergänzt werden kann.

Da die Glykosylierung von Oberflächenproteinen die Effektorfunktionen der Neutrophilen stark beeinflusst (UGONOTTI et al., 2021), war es ein weiteres Ziel dieser Studie, mögliche Veränderungen der Oberflächenglykosylierung von Neutrophilen von an ERU erkrankten Pferden zu finden. Die ERU ist eine schwerwiegende Augenerkrankung beim Pferd, die durch wiederkehrende Entzündungsschübe der Uvea gekennzeichnet ist und final zur Erblindung führen kann (GILGER et al., 1999). Da die genaue Ätiologie der ERU noch nicht geklärt ist (SOTH et al., 2024), werden in der Forschung weiterhin potenzielle Auslöser und treibende Faktoren der pathophysiologischen Vorgänge gesucht. Zudem ist die Detektion funktioneller Veränderungen der Effektorzellen, zum Beispiel auf Basis von Abweichungen im Proteom oder der Oberflächenglykosylierung, bei der ERU von besonderem Interesse, da diese Zellen aus dem peripheren Blut leicht verfügbar sind und somit zur Identifizierung krankheitsvorhersagender Biomarker oder auch als Ansätze für neue Therapiemöglichkeiten genutzt werden könnten. Zwar ist die ERU als T-zell-vermittelte Erkrankung beschrieben, die intraokulär vorwiegend eine CD4+ T-Zellinfiltration zeigt (GILGER et al., 1999; DEEG et al., 2002a), jedoch konnten bei der spontan auftretenden ERU sowie bei der durch IRBP-induzierten Uveitis beim Pferd auch reine Neutrophileninfiltrate, in teilweise sehr frühen Stadien der Erkrankung gezeigt werden (DEEG et al., 2001; DEEG et al., 2002b). Darüber hinaus zeigten zirkulierende Neutrophile bei ERU auch zwischen den Uveitisschüben einen aktivierten Phänotyp (WEIGAND et al., 2021; DEGROOTE et al., 2023) und neigten zur Freisetzung von NETs, die nachweislich mit dem Schweregrad der Erkrankung in Verbindung stehen (FINGERHUT et al., 2019; FINGERHUT et al., 2022), was folglich auf eine aktive Beteiligung der Neutrophilen an der Pathogenese der ERU hinweist.

Neben ihrer Bedeutung für die Tiermedizin ist die ERU ein Modell für die AU des Menschen, da es viele Ähnlichkeiten in der Klinik, der Pathophysiologie und des Immunsystems von Menschen und Pferd gibt (DEEG et al., 2007a; DEEG et al., 2008; HOROHOV, 2015; MALALANA et al., 2015). Da Pferde wie Menschen ein granulozytär geprägtes Blutbild haben (FINGERHUT et al., 2022; AWASTHI und SARODE, 2024), sind Pferde sehr wertvoll für Untersuchungen der initialen, krankheitsauslösenden Ereignisse, die möglicherweise von Neutrophilen vermittelt werden. Im Gegensatz zu

den vorwiegend genutzten Nagermodellen, die ein weniger mit dem Menschen vergleichbares Immunsystem haben (ZSCHALER et al., 2014), ermöglicht die Ähnlichkeit des humanen und equinen Immunsystems eine bessere Übertragbarkeit von Erkenntnissen auf die Pathomechanismen der humanen Erkrankung. Obwohl die AU als T-zell-vermittelt gilt, wird die aktive Beteiligung von Neutrophilen an der Pathogenese der Erkrankung immer deutlicher, da Neutrophile kürzlich eine regulierende Wirkung auf T-Zellen durch die Bildung von NETs zugeschrieben wurde (LI et al., 2025b). Diese Erkenntnisse in Pferden, Menschen und Nagermodellen sprechen dafür, dass Neutrophile aktiv an der Pathophysiologie der ERU und AU beteiligt sind (DEEG et al., 2001; FINGERHUT et al., 2019; WEIGAND et al., 2021; FINGERHUT et al., 2022; HOFFMANN et al., 2022; LI et al., 2025b), was die Rolle des angeborenen Immunsystems in diesen Krankheitsbildern nochmals betont.

Bereits zuvor wurden Untersuchungen zur Glykosylierung im Zusammenhang mit ERU beschrieben, jedoch nicht bei den peripheren Effektorzellen, sondern im Zielgewebe der Retina. In retinalen Müller-Gliazellen, den wichtigsten Makrogliazellen der Retina, die eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Retinafunktion und -integrität spielen, konnten ebenfalls mittels Pflanzenlektinbindung (MAL-2, SNA, WGA) in immunhistochemischen Analysen eine verminderte Abundanz von α 2,3- und α 2,6-gebundenen terminalen Sialinsäuren in der ERU nachgewiesen werden (LORENZ et al., 2021). Die nachgewiesene Desialylierung der uveitischen Müllerzellen, wurde mit der signifikant höheren Abundanz der Neuramidase 1, einer Sialidase, in Verbindung gebracht (LORENZ et al., 2021). In unserer Studie wurden jene α 2,3- und α 2,6-gebundenen terminalen Sialinsäuren ebenfalls auf den equinen Neutrophilen detektiert (MAL-2, SNA), allerdings konnten hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Neutrophilen der gesunden und an ERU erkrankten Pferden festgestellt werden (Tabelle 4.1; Abbildung 4.1; Abbildung 4.7). Folglich ist anzunehmen, dass terminale Sialinstrukturen zur grundlegenden Oberflächenglykanlandschaft der equinen Neutrophilen gehören, die auch im Verlauf einer ERU weitgehend unverändert bleiben.

Im Gegensatz dazu sind bei unseren Untersuchungen zwei andere Glykanstrukturen hervorgetreten, die eine signifikante Veränderung auf Neutrophilen von an ERU erkrankten Pferden im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren zeigten. Dies waren die durch die Pflanzenlektine BanLec und JAC gebundenen Glykanstrukturen (Tabelle

4.1, Abbildung 4.1; Abbildung 4.3). Da Neutrophile inzwischen als heterogene Leukozytenpopulation mit einer Vielzahl an fein abgestimmten Effektorfunktionen anerkannt sind (NG et al., 2019; SILVESTRE-ROIG et al., 2019; WIGERBLAD und KAPLAN, 2023), sind diese signifikanten Veränderungen in der Oberflächenglykosylierung der equinen Neutrophilen besonders im Kontext einer Autoimmunerkrankung wie der ERU interessant, da diese Heterogenität der Zellen möglicherweise durch ihre spezifische Oberflächenglykosylierung beeinflusst, beziehungsweise dargestellt werden könnten.

Obwohl Neutrophilen sowohl in der ERU als auch in anderen autoimmun-medierten Erkrankungen inzwischen eine aktive Rolle beigemessen wurde (DEGROOTE und DEEG, 2020; HERRERO-CERVERA et al., 2022), wurde eine aberrante Glykosylierung bisher nicht auf der Oberfläche von Neutrophilen weder in der ERU noch in der AU des Menschen untersucht (Stand der PubMed-Recherche: 30.09.2025).

Im Gegensatz zu den Neutrophilen, ist eine aberrante Glykosylierung auf Lymphozyten von SLE-Patienten tiefgründiger erforscht (MOREL et al., 2022; SZABO et al., 2024) und zeigt einen deutlichen Zusammenhang zwischen veränderten Glykosylierungen und der Krankheitsaktivität von SLE (SZABO et al., 2024), was eine Beteiligung der veränderten Glykosylierung an der Pathogenese implizierte. Dabei wurde beispielsweise eine erhöhte Core Fukosylierung in aktivierten T-Zellen und inaktiven Plasmablasten aus SLE-Patienten festgestellt, die in beiden Zellarten positiv mit dem SLEDAI-2K Index korrelierten (SZABO et al., 2024). Der SLEDAI-2K Index beschreibt dabei klinische Parameter der SLE, die erhoben werden um die Krankheitsaktivität standardisiert messen zu können (GLADMAN et al., 2002).

Dies zeigt, dass die weitere Erforschung der Oberflächenglykosylierung von Immunzellen, ein wichtiger Schlüssel zur Aufklärung der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen darstellen könnte. In der ERU konnte eine veränderte O-Glykosylierung (JAC) sowie eine veränderte Glukosylierung und Mannosylierung festgestellt werden. Daher ist eine genauere Analyse von Glykosylierungen auf Neutrophilen im Kontext von anderen Autoimmunkrankheiten erstrebenswert, sowie weiterführenden Untersuchungen, die die Bedeutung von aberranten Glykosylierungen näher beleuchten, Neutrophile in vielen Autoimmunkrankheiten wie der ERU, SLE oder der RA einen aktivierten Phänotyp zeigen, der direkt mit der

Erkrankung assoziiert wird (UGONOTTI et al., 2021; WEIGAND et al., 2021). Das dargestellte Resultat der veränderten Oberflächenglykosylierung von ERU-Neutrophilen stellen dabei einen vielversprechenden Ausgangspunkt dar.

Dabei ist die grundsätzliche Charakterisierung der equinen Neutrophilenoberfläche nicht nur eine wertvolle Erkenntnis, um krankheitsassoziierte Unterschiede festzustellen, sondern sie ist auch von großer Bedeutung für die Funktionsweise des equinen Neutrophilen, da Veränderungen in der Glykosylierung auch eine Funktionsänderung von zellulären Proteinen anzeigen könnten (HE et al., 2024).

Beispielsweise ließen sich durch die Analyse der N-Glykosylierung der humanen neutrophilen Elastase auch wichtige Befunde über die Funktion nachweisen (LOKE et al., 2017). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von humanen Neutrophilen zu einer erhöhten Paucimannosylierung der Zelloberfläche führt, die im gleichen Maß wie die erhöhte Abundanz der humanen neutrophilen Elastase auftrat (LOKE et al., 2017). Die Paucimannosylierung der humanen neutrophilen Elastase erleichterte dabei eine Bindung an das humane Mannose-bindende Lektin, das ein immunologisch relevantes Lektin darstellt (LOKE et al., 2017).

Während bei der ERU veränderte Glykosylierungsmuster auf den Neutrophilen gegenüber gesunden Pferden festgestellt wurden, wurden in anderen Autoimmunerkrankungen auch veränderte Glykosylierungen der löslichen Faktoren des Immunsystems beschrieben (HE et al., 2024). So wurden auf den IgG Antikörpern aus dem Serum von Patienten mit RA und dem Serum von Patienten mit multipler Sklerose aberrante Glykosylierungsmuster, die vor allem die N-Glykosylierungen betrafen, im Vergleich zu den IgGs in den Seren aus gesunden Probanden festgestellt (SU et al., 2020; KENNEDY et al., 2022). In den Seren von Patienten mit multipler Sklerose wurden außerdem signifikant erhöhte Konzentrationen von sialylierten und galaktosylierten IgGs im enzymgekoppelten Immunoassay detektiert (KENNEDY et al., 2022). Im Gegensatz dazu wurde im Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis in einer massenspektrometrischen Untersuchung eine signifikant verringerte Galaktosylierung und Sialylierung, sowie eine signifikant erhöhte Fukosylierung des Fc-Fragments des IgGs festgestellt (SU et al., 2020). Im Vergleich mit dem Serum von gesunden Probanden und RA-Patienten mit niedrigem und hohem rheumatoidem Faktor (RF) Titer, wurde des Weiteren festgestellt, dass die RA-Patienten mit hohem RF ebenfalls eine signifikant verringerte Konzentration an sialylierten und

galaktosylierten IgGs gegenüber den gesunden Probanden und den RA-Patienten mit niedrigem RF haben (SU et al., 2020). RA-Patienten mit hohem RF zeigten außerdem eine signifikant erhöhte Konzentration an fukosylierten IgGs (SU et al., 2020). Der RF ist dabei ein Autoantikörper, der an das Fc-Fragment von IgGs bindet (TOGASHI et al., 2025). Der RF-Titer gilt dabei als Klassifikationskriterium für RA und wird auch mit der Schwere der Krankheit assoziiert, gilt aber nicht als spezifisch für RA (TOGASHI et al., 2025). Darüber hinaus konnte in Maus- und Rattenmodellen einer induzierten RA gezeigt werden, dass die Injektion von einer *in vitro* erzeugten mRNA, welche für Glykosyltransferasen zur Regulation der Galaktosylierung und Sialylierung kodiert, zu signifikant geringeren Arthritisanzeichen (Schwellung der Gelenke, verminderte Knochendichte, Gelenksentzündung) führte (PENG et al., 2025). Dabei wurde nachgewiesen, dass Glykosyltransferase-kodierende mRNA zu einer erhöhten Konzentration von galaktosylierten und sialylierten IgGs führten (PENG et al., 2025). Dieser positive antiarthritische Effekt blieb jedoch aus, wenn die Versuchstiere zusätzlich zur Behandlung mit mRNA den Thrombozytenaktivierungshemmer Clopidogrel erhalten haben (PENG et al., 2025). Insgesamt verdeutlichen diese Ergebnisse, dass aberrante Glykosylierungen auf IgGs wesentlich zur Pathogenese der RA als Modell einer autoimmunen Erkrankung beitragen und zudem mit dem Aktivierungszustand der Thrombozyten assoziiert werden konnten (PENG et al., 2025). Eine Beteiligung einer aberranten Antikörperglykosylierung an der Pathogenese einer autoimmun-medierten Krankheit wurde auch in der IgA Nephropathie gezeigt (NOVAK et al., 2024). So tragen in dieser Erkrankung aberrant O-glykosylierte IgA1 Antikörper durch die Bildung von Immunkomplexen mit IgG Autoantikörpern aktiv zur Pathogenese bei (NOVAK et al., 2024), wobei die gebildeten Immunkomplexe auf den Mesangialzellen abgelegt werden und dadurch zu einer Beschädigung der Niere führen (NOVAK et al., 2024). In einer Genomanalyse einer Familie mit IgA Nephropathie wurden dabei mehrere vorhergesagt disfunktionelle GALNT14 Genvarianten identifiziert, die eine fehlerhafte O-Glykosylierung nahe legen (PRAKASH et al., 2025). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die B-Zellen von GALNT-Knockout-Mäusen ebenfalls eine reduzierte O-Glykosylierung auf ihrer Oberfläche zeigen und dadurch die Remigration der B-Zellen zu sekundären lymphoiden Organen gestört war (PRAKASH et al., 2025). Somit konnte gezeigt werden, dass eine aberrante Glykosylierung auf Immunglobulinen in autoimmun-

mediierten Erkrankungen auch auf Immunzellen präsent ist und damit für einen globalen Defekt in der O-Glykosylierung der Erkrankung darstellt (PELL und MENON, 2025; PRAKASH et al., 2025). Dies könnte darauf hindeuten, dass auch die auf ERU-Neutrophilen veränderte O-Glykosylierung, ebenso auf anderen Immunzellen oder Immunglobulinen zu finden ist und stellt somit einen weiteren Ansatzpunkt für weiterführende Untersuchungen dar.

Auf der Oberfläche von Neutrophilen aus an ERU erkrankten Pferden wurde über die Bindung des Pflanzenlektins BanLec ein signifikanter Rückgang von internen α 1,3-Mannosyl- oder Glukosyl-haltigen N-Glykanen und α 1,3- oder α 1,6-Glukosylstrukturen festgestellt (Tabelle 4.1; Abbildung 4.3; Abbildung 4.9). Da BanLec mehrere Spezifitäten aufweist, ist durch das Bindungsverhalten von BanLec allein nicht eindeutig festzustellen, ob der Rückgang der Glykosylierung auf eine einzelne oder mehrere dieser Spezifitäten zurückzuführen ist. Da aber einige Pflanzenlektine, die ebenfalls α 1,3-Mannosylstrukturen binden (ConA, GNL, NPL) (Tabelle 4.1), keinen signifikanten Bindungsunterschied auf der Neutrophilenoberfläche von gesunden und an ERU erkrankten Pferden zeigten (Abbildung 4.3), ist diese Struktur als Grund für den signifikanten Rückgang von BanLec-gebundenen Strukturen auszuschließen. Dass allerdings ein deutlicher Rückgang, der von BanLec gebundenen Oberflächenglykanen auf Neutrophilen von an ERU erkrankten Pferden gezeigt werden konnte, weist auf eine Rolle dieser veränderten Oberflächenstrukturen beziehungsweise der dadurch ausgelösten Signalwege bei der Pathophysiologie der ERU hin. Solch eine Beobachtung wurde im Rahmen von autoimmun-medierten Erkrankungen bisher nicht für Neutrophile beschrieben (Stand der PubMed-Recherche: 21.09.2025). Weitaus besser untersucht sind die mitogenen Eigenschaften von BanLec auf unterschiedliche Leukozytenpopulationen verschiedener Spezies sowie seine antiviralen Eigenschaften bei HIV, Ebola und weiteren viralen Infektionskrankheiten (KRITHIKA et al., 2018; COVES-DATSON et al., 2021; DEGROOTE et al., 2021). Die mitogene Wirkung von BanLec kann durch den Austausch einer einzigen Aminosäure signifikant reduziert werden (SWANSON et al., 2015). Dieser Austausch veränderte zudem die Bindungseigenschaften des Pflanzenlektins und verdeutlichte, dass die mitogene Aktivität von BanLec auf nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen zwei aromatischen Aminosäuren (*engl.* pi-pi staking) beruht (SWANSON et al., 2015). Wie sich die Bindungsspezifität von BanLec

nach Aminosäure-Austausch im Detail verändert hat, ist jedoch bisher nicht vollständig bekannt (SWANSON et al., 2015). Bezüglich seiner mitogenen Eigenschaften konnte weiter gezeigt werden, dass eine Stimulation von porcinen T-Zellen mit BanLec die Proliferation dieser Zellen den JAK-STAT-Signalweg aktivierte (DEGROOTE et al., 2021). Ob ein vergleichbarer Effekt auch bei equinen Neutrophilen auftritt, ist bisher nicht erforscht (Stand der PubMed-Recherche: 01.10.2025), allerdings ist die erste Beschreibung von BanLec-gebundenen Glykanveränderungen auf Neutrophilen in einer autoimmun-medierten Erkrankung eine gute Basis für weitere Untersuchungen. Im Gegensatz zu der signifikant geringeren Abundanz von internen α 1,3-Glukosyl- und -Mannosylstrukturen und reduzierenden terminalen α 1,3- und α 1,6-Glukosylstrukturen, waren Core 1 und Core 3 O-Glykane signifikant höher abundant auf ERU-Neutrophilen (Tabelle 4.1; Abbildung 4.1). Diese O-Glykanstrukturen wurden durch das Pflanzenlektin JAC auf der Oberfläche von equinen Neutrophilen nachgewiesen. Welche Bedeutung und Funktion diese erhöhte O-Glykosylierung auf den equinen Neutrophilen hat, ist bisher allerdings nicht untersucht (Stand der PubMed-Recherche: 01.10.2025). Hingegen konnte in Core 1 Synthase-Knockout-Mäusen festgestellt werden, dass Core 1 O-Glykane auf Neutrophilen wichtige E-Selektinliganden binden, die die Anheftung und das Rollen am Endothel ermöglichen (YAGO et al., 2010). Die Core 1 Synthase transferiert dabei Galaktose an ein GalNac, das über eine α 1-Verknüpfung an ein Serin oder Threonin gebunden ist, und so das Core 1 O-Glykan synthetisiert (siehe Kapitel 2.2.1) (YAGO et al., 2010; CULL et al., 2025). Durch das Fehlen der Core 1 O-Glykosylierung auf den murinen Neutrophilen konnte PSGL-1 nicht an E-Selektin binden und verhinderte damit das Rollen auf dem Endothel *in vitro* und *in vivo* (YAGO et al., 2010) (siehe Kapitel 2.1.3). Des Weiteren wurde in einem murinen Modell bewiesen, dass Neutrophile aus Core 1 Synthase-Knockout-Mäusen eine signifikant verminderte Rekrutierung in entzündetes Gewebe zeigten und somit auch eine verminderte Migration (YAGO et al., 2010). Im Umkehrschluss konnte das bedeuten, dass die von uns detektierte erhöhte Core 1 O-Glykosylierung auf equinen Neutrophilen mit einer gesteigerten Migration in das Zielgewebe Auge einhergehen könnte.

Durch die Inhibition von JAC mit Galaktose, wurde zudem nochmals bestätigt, dass JAC spezifisch für galaktosehaltige Glykane, wie es O-Glykane sind, ist (Abbildung 4.8). Die aberrante O-Glykosylierung auf Neutrophilen von an ERU erkrankten Pferden

ist eine neue Erkenntnis, die bisher nicht untersucht wurde. Dabei kann die gesteigerte Detektion von O-Glykanen auf ERU-Neutrophilen mehrere Ursachen haben: Da Glykosylierungen auf der Zelloberfläche vorwiegend an Proteine gebunden sind, könnten diese Proteine entweder mehr O-Glykosylierungen als gewöhnlich aufweisen oder die O-glykosylierten Proteine sind gleich stark glykosyliert, kommen jedoch an sich mit erhöhter Abundanz auf der Zelloberfläche vor. Unabhängig davon bleibt die funktionelle Bedeutung der signifikant erhöhten O-Glykosylierung auf Neutrophilen von an ERU erkrankten Pferden unklar und muss daher weiter untersucht werden.

Um den Ursprung der spezifischen O-Glykosylierung, die wir über die JAC-Bindung identifiziert haben, weiter zu charakterisieren, wurde in weiteren Analysen auf Neutrophilen nach Glykoproteinen gesucht, die spezifisch JAC-bindende O-Glykosylierungen aufweisen. Nach Anreicherung der JAC-bindenden Glykoproteine und Abgleich der bei 94,5 kDa detektierten (Abbildung 4.11), in ERU vermehrt präzipitierten Proteine mit dem Neutrophilen Proteom, wurden zwei mögliche Membranproteinkandidaten als Anker für die O-Glykosylierung identifiziert: CDCP1 und ITGB2 (Tabelle 4.2).

Obwohl diese beiden Kandidatenproteine ein vielversprechender Ausgangspunkt zur weiteren Erforschung von Pathomechanismen bei der ERU sein könnten, muss bedacht werden, dass die Identifizierung dieser Proteine auf einem indirekten Ansatz basiert, der durch einen Vergleich von JAC-Präzipitationsdaten und Proteomikanalysen durchgeführt wurde. Daher wären weiterführende Untersuchungen wünschenswert, die einen direkten Ansatz zur Bestätigung dieser Proteine, beispielsweise mittels Massenspektrometrie, ermöglichen können.

CDCP 1 ist ein Zellmembranprotein, das auf Epithelzellen und ebenfalls auf einigen Tumorzellen vorkommt (ENYINDAH-ASONYE et al., 2017). Dieses Protein kann zwar potenziell O-glykosyliert vorliegen (STEENTOFT et al., 2013), jedoch ist dies bisher nicht experimentell nachgewiesen worden (Stand der PubMed-Recherche: 14.09.2025). CDCP1 hat ein molekulares Gewicht von 93 kDa und ist somit kleiner als das unbekannte JAC-bindende Protein mit dem berechneten molekularen Gewicht von 94,5 kDa (Abbildung 4.11). In der Proteomanalyse wurde CDCP1 in den ERU-Neutrophilen 2,2-fach höher abundant detektiert als in den Neutrophilen von gesunden Pferden (Tabelle 4.2). Damit wurde ein ähnlicher Abundanzunterschied wie in der durchflusszytometrischen Analyse der JAC-Bindung ermittelt. Die Rolle von CDCP1 in

Neutrophilen wurde bisher allerdings noch nicht untersucht (Stand der PubMed-Recherche: 01.10.2025). Mithilfe einer humanen Fibrosarkomzelllinie, die CDCP1 auf der Zelloberfläche präsentieren, wurde festgestellt, dass CDCP1 ein Ligand für CD6 ist (ENYINDAH-ASONYE et al., 2017). CD6 ist ein Typ-I-Transmembran-Glykoprotein, das von T-Lymphozyten exprimiert wird und an der Pathophysiologie von Autoimmunerkrankungen, wie Multipler Sklerose und rheumatoider Arthritis, beteiligt ist (ENYINDAH-ASONYE et al., 2017; GURREA-RUBIO et al., 2025). Beim Pferd konnte beispielsweise im Zusammenhang zu CD6 gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen, die mit stimulierten PBMCs kultiviert wurden, eine signifikant höhere Abundanz von CD6 haben (REMACHA et al., 2015). Ferner konnte in einer vergleichenden Genomanalyse von gesunden Probanden und Patienten mit Morbus Behcet, einer vaskulären Autoimmunerkrankung, zu deren Leitsymptomen neben Ulcera und Hautläsionen auch eine Uveitis zählt, eine höhere Anfälligkeit für diese Erkrankung bei einem bestimmten Polymorphismus in der DNS-Sequenz von CD6 nachgewiesen werden (ZHENG et al., 2016). Interessanterweise wird CDCP1 hochgradig von humanen und murinen retinalen Pigmentepithelzellen (RPE) exprimiert, und es wurde gezeigt, dass CDCP1 auf den RPEs von EAU-Mäusen signifikant erhöht ist (ZHANG et al., 2022). Die CDCP1-CD6-Interaktion erleichterte die Transmigration von T-Zellen durch die RPE-Monoschicht bei Mäusen, da sie die „Tight-junctions“ zwischen den RPEs schwächt und so die Permeabilität der äußeren Blut-Retina-Schranke erhöht (ZHANG et al., 2022). Dagegen wurde in Mäusen mit einem CDCP1-Gen-Knockout keine Beeinträchtigung der „Tight-junctions“ durch Induktion einer EAU gezeigt, was nochmals hervorhebt, dass CDCP1 an der Pathogenese der AU beteiligt sein könnte (ZHANG et al., 2022). In Anbetracht der Beteiligung an der induzierten EAU bei Mäusen über die CDCP1-CD6-Achse (ZHANG et al., 2022), steht das Vorhandensein und die erhöhte Abundanz von CDCP1 in ERU-Neutrophilen im Einklang mit der Hypothese, dass Neutrophile bei der ERU generell stärker aktiviert sind (WEIGAND et al., 2021). Da CDCP1 aber auch als Marker für hämatopoetische Stammzellen gilt (CONZE et al., 2003), könnte das Vorkommen von CDCP1 auf ERU-Neutrophilen andererseits ein Hinweis auf einen unreifen Typ sein. Daher sind weitere Untersuchungen nötig, um die O-glykosylierung von CDCP1 und dessen Einfluss auf die Funktion von Neutrophilen in der ERU weiter zu spezifizieren. Neben CDCP1 wurde auch ITGB2 als potenzieller Ligand für JAC vorgestellt.

ITGB2 oder auch CD18 ist ein Protein, dessen O-Glykosylierung mittels NetOGlyc 4.0 berechnet wurde (STEENTOFT et al., 2013). Es hat ein Molekulargewicht von 94,8 kDa, befindet sich an der Zellmembran und wurde im Proteom der Neutrophilen mit einer 1,9-fach höheren Abundanz in ERU nachgewiesen (Tabelle 4.2). In immunzytologischen Untersuchungen konnten gezeigt werden, dass ITGB2 auf ERU-Neutrophilen vermehrt abundant ist und mit JAC auf der Zelle ko-lokalisiert ist (Abbildung 4.12). Dies stützt unsere Hypothese, dass JAC an O-glykosyliertes ITGB2 bindet und die gesteigerte Abundanz von ITGB2 auf Neutrophilen von an ERU erkrankten Pferden ein Grund für die von uns detektierte, vermehrt vorliegende O-Glykosylierung sein könnte. ITGB2 gehört zur Familie der Transmembranrezeptoren, die aus nicht-kovalent assoziierten Heterodimeren bestehen, die aus einer α - und einer β -Untereinheit gebildet werden (WEN et al., 2022a). Eines dieser Heterodimere ist das LFA-1, das aus CD11a und ITGB2 (CD18) besteht (PHILLIPSON und KUBES, 2011). Der Bindungspartner von LFA-1 ist ICAM-1, das vorwiegend auf Endothelzellen exprimiert wird und erstmals mit humanen T-Zellen nachgewiesen werden konnte (MARLIN und SPRINGER, 1987; HYUN et al., 2009). In Neutrophilen vermittelt LFA-1 über die Bindung an ICAM-1 die feste Adhäsion an das Endothel, was eine Voraussetzung für die transendotheliale Migration in entzündetes Gewebe darstellt (WEN et al., 2022a) (siehe Kapitel 2.1.4). In der humanen Uveitis ist ICAM-1 ein wichtiges Zelladhäsionsmolekül für Leukozyten, um die retinale transendotheliale Migration zu ermöglichen (TAN et al., 2024). Aktiviert man humane RPE mit inflammatorischen Zytokinen, so kommt es zu einer signifikant erhöhten Expression von ICAM-1 (TAN et al., 2024). Dies impliziert, dass ICAM-1 im okulär inflammatorischen Milieu der ERU ebenfalls vermehrt auf RPE exprimiert sein könnte, wodurch die Bindung des ebenfalls erhöhten ITGB2 im Heterodimer LFA-1 erleichtert werden könnte und dadurch Neutrophilen aus der Peripherie ins Auge transmigrieren. Bereits in den 90er Jahren wurde in einem murinen EAU Modell gezeigt, dass ICAM-1 bereits 7 Tage nach Induktion der EAU im Ziliarkörper und auf der Retina und ab Tag 9 auch LFA-1 auf infiltrierenden inflammatorischen Zellen nachgewiesen werden konnte (WHITCUP et al., 1993). Diese Ergebnisse konnten nochmals reproduziert und zudem gezeigt werden, dass ICAM-1 auch in den Augen von nicht-EAU induzierten Mäusen vorhanden ist und die Expression dieses Moleküls bei Mäusen mit EAU deutlich angestiegen ist (DEWISPELAERE et al., 2015). Weitere Untersuchungen im

Maus- sowie im Rattenmodell der EAU ergaben, dass die Immunisierung mit Anti-ICAM-1- und Anti-LFA-1-Antikörpern zu einer signifikant milderer okulärer Entzündungsreaktion führten und diese zum Teil sogar verhindern konnten (WHITCUP et al., 1993; UCHIO et al., 1994). Folglich wurden ICAM-1 und LFA-1 stark mit der Pathogenese der EAU assoziiert (WHITCUP et al., 1993; UCHIO et al., 1994). In autoreaktiven T-Zellen in der EAU spielt LFA-1 eine wichtige Rolle als stimulierender Faktor, außerdem konnte gezeigt werden, dass LFA-1 an der Infiltration von T-Zellen in das Auge beteiligt ist (KE et al., 2007). Folglich ist anzunehmen, dass das höher abundante ITGB2 als Teil des LFA-1-Homodimers auch bei der Transmigration der Neutrophilen in der ERU eine zentrale Rolle einnehmen könnte. An myeloischen Supressorzellen von tumortragenden Mäusen wurde gezeigt, dass die tumorinfiltrierenden Zellen eine aberrante Glykosylierung aufweisen (BLIDNER et al., 2025) und dabei eine hochgradig bessere Bindung an Gal-1, sowie ein erhöhtes Aufkommen von β 1,6-verzweigten komplexen N-Glykanen und poly-LacNAc-Strukturen und ein vermindertes Aufkommen von nichtsialylierten Core 1 O-Glykanen im Vergleich zu den myeloiden Supressorzellen aus tumornahen Lymphknoten und der Milz zeigten (BLIDNER et al., 2025). Des Weiteren zeigte sich auf diesen Zellen eine Kolokalisation von Gal-1 mit ITGB2, was auf eine Glykosylierung von ITGB2 hindeutet (BLIDNER et al., 2025). Die verstärkte Interaktion von Gal-1 mit den Glykanstrukturen auf den tumorinfiltrierenden myeloischen Supressorzellen könnte in diesem Kontext immunsuppressive und proangiogenetische Effekte anregen, die insgesamt eine Immunevasion des Tumors erlaubt (BLIDNER et al., 2025). Aufgrund dieser Erkenntnisse könnte die erhöhte O-Glykosylierung des ITGB2 auf ERU-Neutrophilen daher auf eine krankheitsspezifische Funktionsänderung des Glykoproteins hindeuten, jedoch sind hier weitere Untersuchungen nötig, da die Interaktion von Gal-1 und ITGB2 bisher beim Pferd kaum erforscht ist (Stand der PubMed-Recherche: 02.10.2025).

Darüber hinaus könnte die aberrante O-Glykosylierung des ITGB2 auch die Funktion des LFA-1-Komplexes beeinflussen und dadurch die Zelladhäsion durch die Bindung an ICAM-1 beeinflussen. ICAM-1 wurde als Bindungspartner von LFA-1 auch in Müllergliazellen von EAU-Mäusen höher abundant nachgewiesen (QUINN et al., 2024). Ferner wurde beim Pferd im Zuge einer Proteomanalyse eine höhere Abundanz von ICAM-1 auf uveitischen Müllerzellen im Vergleich zu Müllerzellen aus gesunden

Pferden gezeigt (FLEISCHER et al., 2025). Daher wäre es sinnvoll in weiteren Experimenten, die Auswirkung der aberranten O-Glykosylierung von ITGB2 auf den LFA-1-Komplex der Neutrophilen und damit auch die verbundene Interaktion von LFA-1 und ICAM-1 auf den an der Blut-Retina-Schranke beteiligten Zellen von an ERU erkrankten Pferden zu untersuchen.

Damit das LFA-1 überhaupt eine Bindung mit ICAM-1 eingehen kann, muss das LFA-1 zunächst aktiviert werden (LEFORT und LEY, 2012). Die Aktivierung erfolgt im Menschen über Signale von Chemokinrezeptoren oder die Bindung von Selektinen an PSGL-1 (KUWANO et al., 2010; LEFORT und LEY, 2012). Daraufhin lagert sich Talin 1 an das kurze zytoplasmatische Ende des ITGB2 in Leukozyten an (LEFORT und LEY, 2012; WEN et al., 2022a), wodurch LFA-1 eine Konformationsänderung durchläuft, die auch als LFA-1-Extension bezeichnet wird und LFA-1 hoch affin für die Bindung an den Liganden ICAM-1 macht (LEFORT und LEY, 2012; LEFORT et al., 2012). Dieser Vorgang wird auch neutrophiles „inside-out signaling“ genannt, dass aus der Aktivierung und der Anlagerung von mehreren Integrinen an der Plasmamembran, was auch „clustering“ genannt wird, besteht (LEFORT und LEY, 2012; CHANGEDE und SHEETZ, 2017). Dabei ist Talin 1 allerdings nur an der Aktivierung während des „inside-out signalings“ beteiligt und nicht am „clustering“, welches die Gesamtbindungsstärke des LFA-1 an ICAM-1 nochmals erhöhen konnte (WU et al., 2025a). Darüber hinaus wurde *in vivo* anhand intravitraler Mikroskopie der Venen im *Musculus cremaster* von Talin 1-Knockout-Mäusen festgestellt, dass Talin 1 essenziell für die Adhäsion und das langsame Rollen der Neutrophilen auf dem Endothel ist und folglich auch keine transzelluläre Migration ohne die Beteiligung von Talin 1 stattfinden kann (LEFORT et al., 2012).

Zwar konnte gezeigt werden, dass O-glykosyliertes ITGB2 auf der Oberfläche Neutrophiler von an ERU erkrankten Pferden höher abundant ist, allerdings konnte bisher nicht gezeigt werden, welche Auswirkungen dies auf die pathophysiologischen Vorgänge in der ERU hat. Talin 1 stellt dabei auch beim Pferd einen möglichen Liganden für ITGB2 dar (WEN et al., 2022a). Das Protein wurde bereits in equinen Neutrophilen nachgewiesen und es konnte dabei gezeigt werden, dass Talin-1 in Neutrophilen von an ERU erkrankten Pferden signifikant geringer abundant vorlag (DEGROOTE et al., 2012; DEGROOTE et al., 2013). Des Weiteren konnte im Pferd CD90 als Interaktor von Talin 1 ermittelt werden und zeigte ebenfalls eine signifikant

geringere Abundanz in Neutrophilen von an ERU erkrankten Pferden (DEGROOTE et al., 2013). STRING-basierte Netzwerk-Analysen konnten zeigen, dass auch ITGB2 und CD90 beim Pferd durch Ko-Expression und Erkenntnisse aus geprüften Datenbanken miteinander assoziiert sind (<https://string-db.org/cgi/network?taskId=bHxyBpgimMVQ&sessionId=bWPwlcKnKJ4d>, Version 12.0, aufgerufen am: 03.10.2025). Ob dies auch auf equine Neutrophile zutrifft, und was potenziellen Interaktionen bewirken, ist dabei nicht bekannt und sollte in weiteren Untersuchungen näher analysiert werden.

Neben diesen spezifischen Aufgaben des ITGB2 in der Zelladhäsion und Transmigration übernimmt dieses Glykoprotein auch wichtige Effektorfunktionen wie Chemotaxis, Phagozytose und die Bildung immunologischer Synapsen (WEN et al., 2022b). Dabei wird deutlich, dass ITGB2 eine zentrale Rolle bei der angeborenen Immunantwort übernimmt, die ebenfalls von einer aberranten Glykosylierung beeinflusst sein könnte (WEN et al., 2022a). Aufgrund der starken Bindung des Pflanzenlektins JAC an Neutrophile von an ERU erkrankten Pferden konnte eine erhöhte O-Glykosylierung im Krankheitszustand nachgewiesen werden, die mit der erhöhten ITGB2-Abundanz in Verbindung stehen könnte. Abweichende Glykanreste auf dem ITGB2-Rezeptormolekül, wie terminale Fucose- und GlcNAc-Glykane sowie sialylierte Glykane, spielen eine Rolle bei der Regulierung der Neutrophilenfunktion, wie transepitheliale Migration, Degranulation, Apoptose und Superoxidbildung bei entzündlichen Schleimhauterkrankungen (BRAZIL et al., 2016; KELM et al., 2020; AZCUTIA et al., 2023). Dies deutet darauf hin, dass eine abweichende O-Glykosylierung auf dem ITGB2-Rezeptor von Neutrophilen einen Einfluss auf die Regulierung von Neutrophilenfunktionen und somit auch Entzündungen haben kann. Da ITGB2-gebundene Glykane als potenzielle Ziele für die selektive Manipulation der Neutrophilenfunktion beschrieben wurden (WEN et al., 2022a), sollte ITGB2 im Zusammenhang mit der ERU weiter untersucht werden.

Die vorliegende Arbeit widmete sich der grundsätzlichen Charakterisierung der Oberflächenglykosylierung von equinen Neutrophilen, die bisher unerforscht war. Im Zuge der Charakterisierung wurden zudem signifikante Unterschiede zwischen der Oberflächenglykosylierung auf Neutrophilen von gesunden und an ERU erkrankten Pferden durch das Glykosyl- und Mannosyl-bindende BanLec und das O-Glykan-bindende JAC festgestellt, die Glykosylierungen auf Glykoproteinen erkennen können.

Mittels eines indirekten Ansatzes wurden die O-glykosylierten Proteine CDGP1 und ITGB2 als potenzielle Bindungspartner für JAC identifiziert. Die Rolle dieser beiden Proteine in der ERU wurde diskutiert und bildet somit eine Grundlage für spezifische weiterführende Untersuchung in der Erforschung dieser Erkrankung.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU) zeigt sich immer wieder, dass in dieser T-zell-medierten Erkrankung auch Neutrophile maßgeblich beteiligt sind, da Neutrophile in der ERU das Auge infiltrieren und in der Peripherie in einem präaktiveren Zustand vorliegen. Die genauen Mechanismen, mit denen die Neutrophilen zur Pathogenese der ERU beitragen, konnten allerdings noch nicht entschlüsselt werden. Da Neutrophile als Ersthelfer bei einer Entzündungsreaktion agieren, können durch die Erforschung der Neutrophilen wichtige Einblicke in die Pathogenese von inflammatorischen Erkrankungen gegeben werden. Gerade, weil inzwischen deutlich geworden ist, dass Neutrophile neben ihren klassischen Abwehrfunktionen auch eine Vielzahl an immunmodulatorische Aufgaben übernehmen, die das angeborene und das adaptive Immunsystem steuern, ist es wichtig, diese heterogene Zellpopulation unter physiologischen wie pathologischen Bedingungen im Körper näher zu erforschen. Über die Funktion der Neutrophilen kann auch ihre Glykosylierung Aufschluss geben, die beispielsweise als Erkennungsmarker auf der Zelloberfläche dient und dadurch wichtige inflammatorische Prozesse wie die Zelladhäsion und -migration steuert.

Das Ziel dieser Studie war es, die Oberflächenglykosylierung der Neutrophilen im gesunden Pferd zu charakterisieren. Darüber hinaus sollte im Vergleich mit der Oberflächenglykosylierung von Neutrophilen aus an ERU erkrankten Pferden mögliche Unterschiede der Oberflächenglykosylierung festgestellt werden. Ferner sollten festgestellte Unterschiede durch weiterführende Untersuchungen näher bestimmt werden. Zur Detektion von Glykanstrukturen auf der Oberfläche von Neutrophilen gesunder und an ERU erkrankter Pferde wurden insgesamt 35 Pflanzenlektine verwendet. Durch ihre unterschiedlichen Bindungsspezifitäten erlaubten sie den Nachweis verschiedener Glykane auf der Zelloberfläche.

Dabei konnten folgende Glykane auf der Oberfläche von equinen Neutrophilen nachgewiesen werden: Typ 2 LacNAc-, terminale α - und β -Galatose- als auch -GalNAc-, α -Fukose-, Core Fukose-, Core 1, 2 und 3 O-Glykan-, α 2,3 sialylierte O-Glykan-, α 2,6 sialylierte LacNAc-, β 1,6-verzweigte und biantennäre N-Glykan- sowie interne α 1,3-Glukosyl- und -Mannosylstrukturen und reduzierende terminale α 1,3- und α 1,6-Glucosylstrukturen

Im Vergleich zu den Neutrophilen von gesunden Pferden, zeigten ERU-Neutrophile

zwei signifikant unterschiedliche Glykosylierungen der Neutrophilenoberfläche. Dabei handelte es sich um eine signifikant verringerte Abundanz von internen α 1,3- Glukosyl- und -Mannosylstrukturen und reduzierende terminale α 1,3- und α 1,6- Glucosylstrukturen auf ERU-Neutrophilen, nachgewiesen durch die Bindung von BanLec und eine signifikant erhöhte Abundanz von Core 1 und Core 3 O-Glykanen, nachgewiesen durch die Bindung von JAC.

Die Bindung von JAC an die Neutrophilenoberfläche konnte durch eine 20%ige Galaktoselösung hochgradig reduziert werden, wodurch nochmals ein Nachweis erbracht wurde, dass JAC spezifisch an Galaktose-haltige O-Glykane bindet.

Um die höher abundante O-Glykosylierung, die durch JAC detektiert wurde, einem spezifischen Glykoprotein zuordnen zu können, wurde über eine JAC-Präzipitation ein unbekanntes Protein mit einem molekularen Gewicht von 94,5 kDa ermittelt. Basierend darauf wurde ein molekulares Gewicht von 90 – 100 kDa, eine Lokalisation auf der Zelloberfläche, eine Abundanzunterschied von 1,1 bis 2,2 zwischen Kontrolle und ERU, eine Detektion in allen Proben sowie eine berechnete O-Glykosylierung als Filterkriterien für die Analyse einer Proteomik von Neutrophilen gesunder und an ERU erkrankter Pferde verwendet. Mittels dieses indirekten Ansatzes wurden CDCP1 und ITGB2 als mögliche Ursachen für die verstärkte JAC-Bindung an Neutrophile von an ERU erkrankten Pferden identifiziert. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass die JAC-gebundene O-Glykosylierung auch unabhängig von einem Glykoprotein auf der Neutrophilenoberfläche präsentiert werden kann.

Als weiterer Nachweis, dass JAC an ein O-glykosyliertes Protein bindet, konnte gezeigt werden, dass ITGB2 auf der equinen Neutrophilenoberfläche mit JAC kolo-kalisiert ist und in höher Abundanz vorlag, was im Einklang mit unseren vorherigen Ergebnissen steht.

Abschließend lässt sich festhalten, dass mit dieser Arbeit erstmals die Oberflächenglykosylierung Neutrophiler von gesunden Pferden charakterisiert wurde. Des Weiteren wurden im Vergleich mit Neutrophilen von an ERU erkrankten Pferden aberrante Glykosylierungsmuster aufgedeckt. Durch diese neuen Erkenntnisse über die Oberflächenglykosylierung von Neutrophilen aus gesunden und an ERU erkrankten Pferden ist ein wichtiges Fundament für weiterführende Untersuchungen in der Erforschung der Funktion der Neutrophilen sowie der ERU geschaffen worden.

7 SUMMARY

In equine recurrent uveitis (ERU), it is repeatedly observed that in this T cell-mediated disease, neutrophils are also significantly involved, as they infiltrate the eye and exist in a pre-activated state in the periphery. However, the exact mechanisms by which neutrophils contribute to the pathogenesis of ERU have not yet been elucidated. Since neutrophils act as first responders in an inflammatory reaction, analyzing them can provide important insights into the pathogenesis of inflammatory diseases. Particularly because it has become clear that neutrophils in addition to their classical defense functions, also perform a variety of immunomodulatory tasks that regulate both the innate and adaptive immune systems, it is important to investigate this heterogeneous cell population under both physiological and pathological conditions.

The function of neutrophils can also be reflected in their glycosylation, which serves, for example, as a recognition marker on the cell surface and thereby regulates important inflammatory processes such as cell adhesion and migration. The aim of this study was to characterize the surface glycosylation of neutrophils in healthy horses. Furthermore, it aimed to identify potential differences in surface glycosylation compared with neutrophils from ERU cases. Any detected differences were intended to be further investigated.

To detect glycan structures on the surface of neutrophils from healthy horses and ERU cases, a total of 35 plant lectins were used. Their different binding specificities allowed the detection of various glycans on the cell surface. The following glycans were identified on the surface of equine neutrophils: type 2 LacNAc, terminal α - and β -galactose and -GalNAc, α -fucose, core fucose, core 1, 2 and 3 O-glycans, α 2,3-sialylated O-glycans, α 2,6-sialylated LacNAc, β 1,6-branched and biantennary N-glycans, as well as internal α 1,3-glucosyl and mannosyl structures and terminal reducing α 1,3- and α 1,6-glucosyl structures.

Compared with neutrophils from healthy horses, ERU neutrophils showed two significantly altered surface glycosylation patterns. There was a significantly reduced abundance of internal α 1,3-glucosyl and mannosyl structures and terminal α 1,3- and α 1,6-glucosyl structures on ERU neutrophils, detected by banana lectin (BanLec) binding and a significantly increased abundance of core 1 and core 3 O-glycans, detected by jacalin (JAC) binding.

SUMMARY

JAC binding to the neutrophil surface could be highly reduced by a 20% galactose solution, providing further evidence that JAC specifically binds to galactose-containing O-glycans. To assign the increased O-glycosylation detected by JAC to a specific glycoprotein, a JAC pull down identified an unknown protein with a molecular weight of 94.5 kDa. Based on this, a molecular weight of 90-100 kDa, localization on the cell surface, an abundance difference of 1.1 to 2.2 between control and ERU, detection in all samples and predicted O-glycosylation were used as filter criteria for proteomic analysis of neutrophils from healthy horses and ERU cases. Using this indirect approach, CUB domain-containing protein 1 (CDCP1) and Integrin beta 2 (ITGB2) were identified as possible contributors to the enhanced JAC binding on neutrophils from ERU cases. It should be noted that JAC-bound O-glycosylation can also be presented independently of a glycoprotein on the neutrophil surface.

As further evidence that JAC binds to an O-glycosylated protein, it was shown that ITGB2 co-localizes with JAC on the equine neutrophil surface and is present in higher abundance, consistent with previous results.

In conclusion, this study provides the first characterization of neutrophil surface glycosylation in healthy horses. Furthermore, comparison with neutrophils from ERU cases revealed aberrant glycosylation patterns. These new insights into the surface glycosylation of neutrophils from healthy horses and ERU cases establish an important foundation for further investigations into neutrophil function and ERU pathogenesis.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Acharya KR, Ackerman SJ. Eosinophil granule proteins: form and function. *J Biol Chem* 2014; 289: 17406-15.
- Acharya NR, Tham VM, Esterberg E, Borkar DS, Parker JV, Vinoya AC, Uchida A. Incidence and prevalence of uveitis: results from the Pacific Ocular Inflammation Study. *JAMA Ophthalmol* 2013; 131: 1405-12.
- Acharya S, Patanjali SR, Sajjan SU, Gopalakrishnan B, Surolia A. Thermodynamic analysis of ligand binding to winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) acidic agglutinin reveals its specificity for terminally monofucosylated H-reactive sugars. *J Biol Chem* 1990; 265: 11586-94.
- Aleyd E, Al M, Tuk CW, van der Laken CJ, van Egmond M. IgA Complexes in Plasma and Synovial Fluid of Patients with Rheumatoid Arthritis Induce Neutrophil Extracellular Traps via Fc α RI. *J Immunol* 2016; 197: 4552-9.
- Ambler WG, Kaplan MJ. Vascular damage in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Nephrol* 2024; 20: 251-65.
- Andre S, Kaltner H, Kayser K, Murphy PV, Gabius HJ. Merging carbohydrate chemistry with lectin histochemistry to study inhibition of lectin binding by glycoclusters in the natural tissue context. *Histochem Cell Biol* 2016; 145: 185-99.
- Awasthi D, Sarode A. Neutrophils at the Crossroads: Unraveling the Multifaceted Role in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci* 2024; 25
- Azcutia V, Kelm M, Fink D, Cummings RD, Nusrat A, Parkos CA, Brazil JC. Sialylation regulates neutrophil transepithelial migration, CD11b/CD18 activation, and intestinal mucosal inflammatory function. *JCI Insight* 2023; 8
- Barfusser C, Wiedemann C, Hoffmann ALC, Hirmer S, Deeg CA. Altered Metabolic Phenotype of Immune Cells in a Spontaneous Autoimmune Uveitis Model. *Front Immunol* 2021; 12: 601619.
- Bargatze RF, Kurk S, Butcher EC, Jutila MA. Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *J Exp Med* 1994; 180: 1785-92.
- Birkmann K, Jebbawi F, Waldern N, Hug S, Inversini V, Keller G, Holm A, Grest P, Canonica F, Schmid-Grendelmeier P, Fettelschoss-Gabriel A. Eosinophils Play a Surprising Leading Role in Recurrent Urticaria in Horses. *Vaccines (Basel)* 2024; 12
- Blanco-Camarillo C, Aleman OR, Rosales C. Low-Density Neutrophils in Healthy Individuals Display a Mature Primed Phenotype. *Front Immunol* 2021; 12: 672520.
- Blidner AG, Bach CA, Garcia PA, Merlo JP, Cagnoni AJ, Bannoud N, Manselle Cocco MN, Perez Saez JM, Pinto NA, Torres NI, Sarrias L, Dalotto-Moreno T, Gatto SG, Morales RM, Giribaldi ML, Stupirski JC, Cerliani JP, Bellis SL, Salatino M, Troncoso MF, Marino KV, Abba MC, Croci DO, Rabinovich GA. Glycosylation-driven programs coordinate immunoregulatory and pro-angiogenic functions of myeloid-derived suppressor cells. *Immunity* 2025; 58: 1553-71 e8.
- Bojar D, Meche L, Meng G, Eng W, Smith DF, Cummings RD, Mahal LK. A Useful Guide to Lectin Binding: Machine-Learning Directed Annotation of 57 Unique Lectin Specificities. *ACS Chem Biol* 2022; 17: 2993-3012.
- Borregaard N, Sehested M, Nielsen BS, Sengelov H, Kjeldsen L. Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation. *Blood* 1995; 85: 812-7.
- Bowers E, Entrup GP, Islam M, Mohan R, Lerner A, Mancuso P, Moore BB, Singer K. High fat diet feeding impairs neutrophil phagocytosis, bacterial killing, and neutrophil-induced hematopoietic regeneration. *J Immunol* 2025; 214: 680-93.
- Bradley D. The evolution of post-translational modifications. *Curr Opin Genet Dev* 2022; 76: 101956.
- Bravo-Zehnder M, Toledo EM, Segovia-Miranda F, Serrano FG, Benito MJ, Metz C, Retamal C, Alvarez A, Massardo L, Inestrosa NC, Gonzalez A. Anti-ribosomal P protein autoantibodies from patients with neuropsychiatric lupus impair memory in mice. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67: 204-14.

- Brazil JC, Sumagin R, Cummings RD, Louis NA, Parkos CA. Targeting of Neutrophil Lewis X Blocks Transepithelial Migration and Increases Phagocytosis and Degranulation. *Am J Pathol* 2016; 186: 297-311.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303: 1532-5.
- Brinkmann V, Goosmann C, Maier A, Meyer T, Foti A. SOD1 controls neutrophil oxidative burst and microbial killing. *J Immunol* 2025;
- Burn GL, Foti A, Marsman G, Patel DF, Zychlinsky A. The Neutrophil. *Immunity* 2021; 54: 1377-91.
- Calzetti F, Finotti G, Tamassia N, Bianchetto-Aguilera F, Castellucci M, Cane S, Lonardi S, Cavallini C, Matte A, Gasperini S, Signoretto I, Benedetti F, Bonifacio M, Vermi W, Ugel S, Bronte V, Tecchio C, Scapini P, Cassatella MA. CD66b(-)CD64(dim)CD115(-) cells in the human bone marrow represent neutrophil-committed progenitors. *Nature Immunology* 2022; 23: 679-91.
- Calzetti F, Finotti G, Cassatella MA. Current knowledge on the early stages of human neutropoiesis. *Immunol Rev* 2023; 314: 111-24.
- Caspi RR, Roberge FG, McAllister CG, el-Saied M, Kuwabara T, Gery I, Hanna E, Nussenblatt RB. T cell lines mediating experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in the rat. *J Immunol* 1986; 136: 928-33.
- Caspi RR, Roberge FG, Chan CC, Wiggert B, Chader GJ, Rozenszajn LA, Lando Z, Nussenblatt RB. A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. *J Immunol* 1988; 140: 1490-5.
- Caspi RR, Silver PB, Luger D, Tang J, Cortes LM, Pennesi G, Mattapallil MJ, Chan CC. Mouse models of experimental autoimmune uveitis. *Ophthalmic Res* 2008; 40: 169-74.
- Chan CC, Caspi RR, Roberge FG, Nussenblatt RB. Dynamics of experimental autoimmune uveoretinitis induced by adoptive transfer of S-antigen-specific T cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988; 29: 411-8.
- Changde R, Sheetz M. Integrin and cadherin clusters: A robust way to organize adhesions for cell mechanics. *Bioessays* 2017; 39: 1-12.
- Conze T, Lammers R, Kuci S, Scherl-Mostageer M, Schweifer N, Kanz L, Buhning HJ. CDCP1 is a novel marker for hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 996: 222-6.
- Coves-Datson EM, King SR, Legendre M, Swanson MD, Gupta A, Claes S, Meagher JL, Boonen A, Zhang L, Kalveram B, Raglow Z, Freiberg AN, Prichard M, Stuckey JA, Schols D, Markovitz DM. Targeted disruption of pi-pi stacking in Malaysian banana lectin reduces mitogenicity while preserving antiviral activity. *Sci Rep* 2021; 11: 656.
- Cowland JB, Borregaard N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol Rev* 2016; 273: 11-28.
- Cull J, Pink RC, Samuel P, Brooks SA. Myriad mechanisms: factors regulating the synthesis of aberrant mucin-type O-glycosylation found on cancer cells. *Glycobiology* 2025; 35
- da Silva Correia J, Ulevitch RJ. MD-2 and TLR4 N-linked glycosylations are important for a functional lipopolysaccharide receptor. *J Biol Chem* 2002; 277: 1845-54.
- Damascena HL, Silveira WAA, Castro MS, Fontes W. Neutrophil Activated by the Famous and Potent PMA (Phorbol Myristate Acetate). *Cells* 2022; 11
- De Filippo K, Dudeck A, Hasenberg M, Nye E, van Rooijen N, Hartmann K, Gunzer M, Roers A, Hogg N. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood* 2013; 121: 4930-7.
- Deeg CA, Kaspers B, Gerhards H, Thureau SR, Wollanke B, Wildner G. Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 393-8.
- Deeg CA, Ehrenhofer M, Thureau SR, Reese S, Wildner G, Kaspers B. Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Exp Eye Res* 2002a; 75: 127-33.

- Deeg CA, Thureau SR, Gerhards H, Ehrenhofer M, Wildner G, Kaspers B. Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease. *Eur J Immunol* 2002b; 32: 2598-606.
- Deeg CA, Reese S, Gerhards H, Wildner G, Kaspers B. The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 2286-92.
- Deeg CA, Pompetzki D, Raith AJ, Hauck SM, Amann B, Suppmann S, Goebel TW, Olazabal U, Gerhards H, Reese S, Stangassinger M, Kaspers B, Ueffing M. Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: 1462-70.
- Deeg CA, Raith AJ, Amann B, Crabb JW, Thureau SR, Hauck SM, Ueffing M, Wildner G, Stangassinger M. CRALBP is a highly prevalent autoantigen for human autoimmune uveitis. *Clinical & Developmental Immunology* 2007a;
- Deeg CA, Altmann F, Hauck SM, Schoeffmann S, Amann B, Stangassinger M, Ueffing M. Down-regulation of pigment epithelium-derived factor in uveitic lesion associates with focal vascular endothelial growth factor expression and breakdown of the blood-retinal barrier. *Proteomics* 2007b; 7: 1540-8.
- Deeg CA, Hauck SM, Amann B, Pompetzki D, Altmann F, Raith A, Schmalzl T, Stangassinger M, Ueffing M. Equine recurrent uveitis--a spontaneous horse model of uveitis. *Ophthalmic Res* 2008; 40: 151-3.
- Degroote RL, Hauck SM, Kremmer E, Amann B, Ueffing M, Deeg CA. Altered expression of talin 1 in peripheral immune cells points to a significant role of the innate immune system in spontaneous autoimmune uveitis. *J Proteomics* 2012; 75: 4536-44.
- Degroote RL, Hauck SM, Treutlein G, Amann B, Fröhlich KJH, Kremmer E, Merl J, Stangassinger M, Ueffing M, Deeg CA. Expression Changes and Novel Interaction Partners of Talin 1 in Effector Cells of Autoimmune Uveitis. *Journal of Proteome Research* 2013; 12: 5812-9.
- Degroote RL, Weigand M, Hauck SM, Deeg CA. IL8 and PMA Trigger the Regulation of Different Biological Processes in Granulocyte Activation. *Front Immunol* 2019; 10: 3064.
- Degroote RL, Deeg CA. Immunological Insights in Equine Recurrent Uveitis. *Front Immunol* 2020; 11: 609855.
- Degroote RL, Korbonits L, Stetter F, Kleinwort KJH, Schilloks MC, Amann B, Hirmer S, Hauck SM, Deeg CA. Banana Lectin from Is Mitogenic for Cow and Pig PBMC via IL-2 Pathway and ELF1. *Immuno* 2021; 1: 264-76.
- Degroote RL, Schmalen A, Hauck SM, Deeg CA. Unveiling Differential Responses of Granulocytes to Distinct Immunostimulants with Implications in Autoimmune Uveitis. *Biomedicine* 2023; 12
- DeNotta S, McFarlane D. Immunosenescence and inflammaging in the aged horse. *Immun Ageing* 2023; 20: 2.
- Devi S, Wang Y, Chew WK, Lima R, N AG, Mattar CN, Chong SZ, Schlitzer A, Bakocevic N, Chew S, Keeble JL, Goh CC, Li JL, Evrard M, Malleret B, Larbi A, Renia L, Haniffa M, Tan SM, Chan JK, Balabanian K, Nagasawa T, Bachelier F, Hidalgo A, Ginhoux F, Kuberski P, Ng LG. Neutrophil mobilization via plerixafor-mediated CXCR4 inhibition arises from lung demargination and blockade of neutrophil homing to the bone marrow. *J Exp Med* 2013; 210: 2321-36.
- Dewispelaere R, Lipski D, Foucart V, Bruyns C, Frere A, Caspers L, Willermain F. ICAM-1 and VCAM-1 are differentially expressed on blood-retinal barrier cells during experimental autoimmune uveitis. *Exp Eye Res* 2015; 137: 94-102.
- Doucey MA, Hess D, Cacan R, Hofsteenge J. Protein C-mannosylation is enzyme-catalysed and uses dolichyl-phosphate-mannose as a precursor. *Mol Biol Cell* 1998; 9: 291-300.
- Dwyer AE. Management of blind horses. *Equine ophthalmology* 2022: 798-820.
- Ehrlich P. Ueber die spezifischen Granulationen des Blutes. *Archiv für Anatomie und Physiologie. Physiologische Abteilung* 1879: 571-9.
- Eichelberger KR, Goldman WE. Manipulating neutrophil degranulation as a bacterial virulence strategy. *PLoS Pathog* 2020; 16: e1009054.

- Enyindah-Asonye G, Li Y, Ruth JH, Spassov DS, Hebron KE, Zijlstra A, Moasser MM, Wang B, Singer NG, Cui H, Ohara RA, Rasmussen SM, Fox DA, Lin F. CD318 is a ligand for CD6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114: E6912-E21.
- Evrard M, Kwok IWH, Chong SZ, Teng KWW, Becht E, Chen J, Sieow JL, Penny HL, Ching GC, Devi S, Adrover JM, Li JLY, Liong KH, Tan L, Poon Z, Foo S, Chua JW, Su IH, Balabanian K, Bachelerie F, Biswas SK, Larbi A, Hwang WYK, Madan V, Koeffler HP, Wong SC, Newell EW, Hidalgo A, Ginhoux F, Ng LG. Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions. *Immunity* 2018; 48: 364-79 e8.
- Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 2003; 5: 1317-27.
- Fingerhut L, Ohnesorge B, von Borstel M, Schumski A, Strutzberg-Minder K, Morgelin M, Deeg CA, Haagsman HP, Beineke A, von Kockritz-Blickwede M, de Buhr N. Neutrophil Extracellular Traps in the Pathogenesis of Equine Recurrent Uveitis (ERU). *Cells* 2019; 8
- Fingerhut L, Dolz G, de Buhr N. What Is the Evolutionary Fingerprint in Neutrophil Granulocytes? *Int J Mol Sci* 2020; 21
- Fingerhut L, Yucel L, Strutzberg-Minder K, von Kockritz-Blickwede M, Ohnesorge B, de Buhr N. Ex Vivo and In Vitro Analysis Identify a Detrimental Impact of Neutrophil Extracellular Traps on Eye Structures in Equine Recurrent Uveitis. *Front Immunol* 2022; 13: 830871.
- Fischer BM, McMullen RJ, Jr., Reese S, Brehm W. Intravitreal injection of low-dose gentamicin for the treatment of recurrent or persistent uveitis in horses: Preliminary results. *BMC Vet Res* 2019; 15: 29.
- Fischoder T, Laaf D, Dey C, Elling L. Enzymatic Synthesis of N-Acetyllactosamine (LacNAc) Type 1 Oligomers and Characterization as Multivalent Galectin Ligands. *Molecules* 2017; 22
- Fleischer AB, Amann B, von Toerne C, Degroote RL, Schmalen A, Weisser T, Hauck SM, Deeg CA. Differential Expression of ARG1 and MRC2 in Retinal Muller Glial Cells During Autoimmune Uveitis. *Biomolecules* 2025; 15
- Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun* 2010; 2: 216-27.
- Fu C, Zhao H, Wang Y, Cai H, Xiao Y, Zeng Y, Chen H. Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen. *HLA* 2016; 88: 275-86.
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007; 176: 231-41.
- Furze RC, Rankin SM. The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. *FASEB J* 2008; 22: 3111-9.
- Gagnon NA, Hartley C, Gilger BC. Efficacy and safety of suprachoroidal triamcinolone injection in horses with poorly responsive equine recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol* 2021; 24: 308-12.
- Garrido-Trigo A, Corraliza AM, Veny M, Dotti I, Melon-Ardanaz E, Rill A, Crowell HL, Corbi A, Gudino V, Esteller M, Alvarez-Teubel I, Aguilar D, Masamunt MC, Killingbeck E, Kim Y, Leon M, Visvanathan S, Marchese D, Caratu G, Martin-Cardona A, Esteve M, Ordas I, Panes J, Ricart E, Mereu E, Heyn H, Salas A. Macrophage and neutrophil heterogeneity at single-cell spatial resolution in human inflammatory bowel disease. *Nat Commun* 2023; 14: 4506.
- Geering B, Stoeckle C, Conus S, Simon HU. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends in Immunology* 2013; 34: 398-409.
- Gigon L, Fettelet T, Yousefi S, Simon D, Simon HU. Eosinophils from A to Z. *Allergy* 2023; 78: 1810-46.
- Gilger BC, Malok E, Cutter KV, Stewart T, Horohov DW, Allen JB. Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 71: 17-28.
- Gilger BC, Michau TM. Equine recurrent uveitis: new methods of management. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2004; 20: 417-27, vii.

- Gilger BC. Equine recurrent uveitis: the viewpoint from the USA. *Equine Vet J Suppl* 2010; 57-61.
- Gilger BC, Wilkie DA, Clode AB, McMullen RJ, Jr., Utter ME, Komaromy AM, Brooks DE, Salmon JH. Long-term outcome after implantation of a suprachoroidal cyclosporine drug delivery device in horses with recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol* 2010; 13: 294-300.
- Gilger BC, Degroote R, Deeg C. Diseases of the uvea, uveitis, and recurrent uveitis. *Equine ophthalmology* 2022; 441-98.
- Giovannone N, Antonopoulos A, Liang J, Geddes Sweeney J, Kudelka MR, King SL, Lee GS, Cummings RD, Dell A, Barthel SR, Widlund HR, Haslam SM, Dimitroff CJ. Human B Cell Differentiation Is Characterized by Progressive Remodeling of O-Linked Glycans. *Front Immunol* 2018; 9: 2857.
- Gladman DD, Ibanez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol* 2002; 29: 288-91.
- Goldberg GL, Cornish AL, Murphy J, Pang ES, Lim LL, Campbell IK, Scalzo-Inguanti K, Chen X, McMenemy PG, Maraskovsky E, McKenzie BS, Wicks IP. G-CSF and Neutrophils Are Nonredundant Mediators of Murine Experimental Autoimmune Uveoretinitis. *Am J Pathol* 2016; 186: 172-84.
- Goldschmeding R, van Dalen CM, Faber N, Calafat J, Huizinga TW, van der Schoot CE, Clement LT, von dem Borne AE. Further characterization of the NB 1 antigen as a variably expressed 56-62 kD GPI-linked glycoprotein of plasma membranes and specific granules of neutrophils. *Br J Haematol* 1992; 81: 336-45.
- Gonzalez-Gil A, Schnaar RL. Siglec Ligands. *Cells* 2021; 10
- Gurrea-Rubio M, Fox DA, Castresana JS. CD6 in Human Disease. *Cells* 2025; 14
- Hacbarth E, Kajdacsy-Balla A. Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 1334-42.
- Hassani M, Hellebrekers P, Chen N, van Aalst C, Bongers S, Hietbrink F, Koenderman L, Vrisekoop N. On the origin of low-density neutrophils. *J Leukoc Biol* 2020; 107: 809-18.
- Haydinger CD, Ashander LM, Tan ACR, Smith JR. Intercellular Adhesion Molecule 1: More than a Leukocyte Adhesion Molecule. *Biology (Basel)* 2023; 12
- He C, Yu CR, Sun L, Mahdi RM, Larkin J, 3rd, Egwuagu CE. Topical administration of a suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) mimetic peptide inhibits ocular inflammation and mitigates ocular pathology during mouse uveitis. *J Autoimmun* 2015; 62: 31-8.
- He M, Zhou X, Wang X. Glycosylation: mechanisms, biological functions and clinical implications. *Signal Transduct Target Ther* 2024; 9: 194.
- He W, Yan L, Hu D, Hao J, Liou YC, Luo G. Neutrophil heterogeneity and plasticity: unveiling the multifaceted roles in health and disease. *MedComm (2020)* 2025; 6: e70063.
- Helenius A, Aebi M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 1019-49.
- Henning S, Reimers T, Abdulahad W, Fierro JJ, Doornbos-van der Meer B, Bootsma H, Horvath B, de Leeuw K, Westra J. Low-density granulocytes and neutrophil extracellular trap formation are increased in incomplete systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2025; 64: 1234-42.
- Herrero-Cervera A, Soehnlein O, Kenne E. Neutrophils in chronic inflammatory diseases. *Cell Mol Immunol* 2022; 19: 177-91.
- Herteman N, Vargas A, Lavoie JP. Characterization of Circulating Low-Density Neutrophils Intrinsic Properties in Healthy and Asthmatic Horses. *Sci Rep* 2017; 7: 7743.
- Hirata T, Kizuka Y. N-Glycosylation. *Adv Exp Med Biol* 2021; 1325: 3-24.
- Hoffmann ALC, Hauck SM, Deeg CA, Degroote RL. Pre-Activated Granulocytes from an Autoimmune Uveitis Model Show Divergent Pathway Activation Profiles upon IL8 Stimulation In Vitro. *Int J Mol Sci* 2022; 23
- Horohov DW. The equine immune responses to infectious and allergic disease: A model for humans? *Molecular Immunology* 2015; 66: 89-96.

- Hosoi E. Biological and clinical aspects of ABO blood group system. *J Med Invest* 2008; 55: 174-82.
- Howard OM, Dong HF, Su SB, Caspi RR, Chen X, Plotz P, Oppenheim JJ. Autoantigens signal through chemokine receptors: uveitis antigens induce CXCR3- and CXCR5-expressing lymphocytes and immature dendritic cells to migrate. *Blood* 2005; 105: 4207-14.
- Huang T, Xie W, Guo Y, Li Y, Yin J, Jin X, Ma Y, Zhang Y, Huang D, Chen C, Wang X, Zhu Z, Gan Y, Liesz A, Yu W, Yuan J, Li P. St3gal5-mediated sialylation of glyco-CD177 on neutrophils restricts neuroinflammation following CNS injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2025; 122: e2426187122.
- Hughes V, Humphreys JM, Edwards SW. Protein synthesis is activated in primed neutrophils: a possible role in inflammation. *Biosci Rep* 1987; 7: 881-90.
- Hussain M, Liu G. Eosinophilic Asthma: Pathophysiology and Therapeutic Horizons. *Cells* 2024; 13
- Hyun YM, Lefort CT, Kim M. Leukocyte integrins and their ligand interactions. *Immunol Res* 2009; 45: 195-208.
- Jebbawi F, Chemnitzer A, Dietrich M, Pantelyushin S, Lam J, Rhiner T, Keller G, Waldern N, Canonica F, Fettelschoss-Gabriel A. Cytokines and chemokines skin gene expression in correlation with immune cells in blood and severity in equine insect bite hypersensitivity. *Front Immunol* 2024; 15: 1414891.
- Ji J, Zhong H, Li Y, Billiar TR, Wilson MA, Scott MJ, Fan J. IRG1/ACOD1 promotes neutrophil reverse migration and alleviates local inflammation. *J Leukoc Biol* 2024; 116: 854-63.
- Jiang L, Su Z, Zhang Y, Liu H, Wang H. LPS promotes the production of ROS in neutrophils to regulate their killing activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep* 2025; 15: 26785.
- Jing W, Pilato JL, Kay C, Feng S, Tuipulotu DE, Mathur A, Shen C, Ngo C, Zhao A, Miosge LA, Ali SA, Gardiner EE, Awad MM, Lyras D, Robertson AAB, Kaakoush NO, Man SM. Clostridium septicum alpha-toxin activates the NLRP3 inflammasome by engaging GPI-anchored proteins. *Sci Immunol* 2022; 7: eabm1803.
- Jobe T, Stephan J, Wells CK, De Silva M, Lorkiewicz PK, Hill BG, Wysoczynski M. Phase partitioning of the neutrophil oxidative burst is coordinated by accessory pathways of glucose metabolism and mitochondrial activity. *J Biol Chem* 2025; 301: 108091.
- Joseph AM, Yasmin H, Kishore U. Innate Lymphoid Cells. *Adv Exp Med Biol* 2025; 1476: 31-46.
- Kalemoglu E, Caner A. Bioinformatic Analysis of C1GALT1 in Cancer: Insights Into Prognosis, Metastasis and Therapeutic Potential. *Cancer Rep (Hoboken)* 2025; 8: e70259.
- Kamsom C, Edwards SW, Thaosing J, Papalee S, Pientong C, Kurosu T, Phanthanawiboon S. Altered neutrophil responses to dengue virus serotype three: delayed apoptosis is regulated by stabilisation of Mcl-1. *Sci Rep* 2024; 14: 18414.
- Kang DH, Gho YS, Suh MK, Kang CH. Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 2002; 23: 1511-2.
- Karagianni AE, Lisowski ZM, Hume DA, Scott Pirie R. The equine mononuclear phagocyte system: The relevance of the horse as a model for understanding human innate immunity. *Equine Vet J* 2021; 53: 231-49.
- Karagianni AE, Richard EA, Toquet MP, Hue ES, Courouce-Malblanc A, McGorum B, Kurian D, Aguilar J, Mazeri S, Wishart TM, Pirie RS. Distinct Molecular Profiles Underpin Mild-To-Moderate Equine Asthma Cytological Profiles. *Cells* 2024; 13
- Kastl BC, Pohlman LM. Basophils, Mast Cells, and Their Disorders. In: *Schalm's Veterinary Hematology*: 2022: 373-80.
- Kauskot A, Ramstrom S, Nipoti T, van der Wal DE. Consensus protocol for platelet desialylation (beta-galactose exposure) quantification using lectins by flow cytometry: communication from the ISTH SSC Subcommittee on Platelet Physiology. *J Thromb Haemost* 2025; 23: 2050-9.
- Kawahara R, Ugonotti J, Chatterjee S, Tjondro HC, Loke I, Parker BL, Venkatakrisnan V, Dieckmann R, Sumer-Bayraktar Z, Karlsson-Bengtsson A, Bylund J, Thaysen-Andersen M. Glycoproteome remodeling and organelle-specific N-glycosylation accompany neutrophil granulopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2023; 120: e2303867120.

- Kay AB. Paul Ehrlich and the Early History of Granulocytes. *Microbiol Spectr* 2016; 4
- Ke Y, Sun D, Zhang P, Jiang G, Kaplan HJ, Shao H. Suppression of established experimental autoimmune uveitis by anti-LFA-1 α Ab. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 2667-75.
- Kelm M, Lehoux S, Azcutia V, Cummings RD, Nusrat A, Parkos CA, Brazil JC. Regulation of neutrophil function by selective targeting of glycan epitopes expressed on the integrin CD11b/CD18. *FASEB J* 2020; 34: 2326-43.
- Kennedy PGE, Graner M, Pointon T, Li X, Tanimoto K, Dennison K, Im G, Fringuello A, Zhou W, Graner A, Sillau S, Vollmer T, Yu X. Aberrant Immunoglobulin G Glycosylation in Multiple Sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol* 2022; 17: 218-27.
- Kerr EC, Raveney BJ, Copland DA, Dick AD, Nicholson LB. Analysis of retinal cellular infiltrate in experimental autoimmune uveoretinitis reveals multiple regulatory cell populations. *J Autoimmun* 2008; 31: 354-61.
- Kim HK, De La Luz Sierra M, Williams CK, Gulino AV, Tosato G. G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells. *Blood* 2006; 108: 812-20.
- Kim MK, Caspi RR, Nussenblatt RB, Kuwabara T, Palestine AG. Intraocular trafficking of lymphocytes in locally induced experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). *Cell Immunol* 1988; 112: 430-6.
- Kingsley NB, Sandmeyer L, Parker SE, Dwyer A, Heden S, Reilly C, Hallendar-Edman A, Archer S, Bellone RR. Risk factors for insidious uveitis in the Knabstrupper breed. *Equine Vet J* 2023; 55: 820-30.
- Kinoshita T, Fujita M. Biosynthesis of GPI-anchored proteins: special emphasis on GPI lipid remodeling. *J Lipid Res* 2016; 57: 6-24.
- Kobayashi T, Suzuki T, Kawahara R, Harai N, Dohmae N, Simizu S. C-mannosylation promotes ADAMTS1 activation and secretion in human testicular germ cell tumor NEC8 cells. *FEBS Lett* 2025;
- Kohler A, De Filippo K, Hasenberg M, van den Brandt C, Nye E, Hosking MP, Lane TE, Mann L, Ransohoff RM, Hauser AE, Winter O, Schraven B, Geiger H, Hogg N, Gunzer M. G-CSF-mediated thrombopoietin release triggers neutrophil motility and mobilization from bone marrow via induction of Cxcr2 ligands. *Blood* 2011; 117: 4349-57.
- Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 159-75.
- Krithika N, Pramod SN, Mahesh PA, Venkatesh YP. Banana lectin (BanLec) induces non-specific activation of basophils and mast cells in atopic subjects. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2018; 50: 243-53.
- Kulczykcki A, Jr., Isersky C, Metzger H. The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells. I. Evidence for specific binding of IgE. *J Exp Med* 1974; 139: 600-16.
- Kuwano Y, Spelten O, Zhang H, Ley K, Zarbock A. Rolling on E- or P-selectin induces the extended but not high-affinity conformation of LFA-1 in neutrophils. *Blood* 2010; 116: 617-24.
- Lacy P. Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2006; 2: 98-108.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
- Lamriben L, Graham JB, Adams BM, Hebert DN. N-Glycan-based ER Molecular Chaperone and Protein Quality Control System: The Calnexin Binding Cycle. *Traffic* 2016; 17: 308-26.
- Larson EM, Wagner B. Viral infection and allergy - What equine immune responses can tell us about disease severity and protection. *Molecular Immunology* 2021; 135: 329-41.
- Launois T, Gonzalez Hilarion LM, Barbe F, Leurquin C, Bihin B, Hontoir F, Dugdale A, Vandeweerd JM. Use of Intravitreal Injection of Gentamicin in 71 Horses With Equine Recurrent Uveitis. *J Equine Vet Sci* 2019; 77: 93-7.
- Leblanc PO, Bourgoin SG, Poubelle PE, Tessier PA, Pelletier M. Metabolic regulation of neutrophil functions in homeostasis and diseases. *J Leukoc Biol* 2024; 116: 456-68.

- Lee KH, Kronbichler A, Park DD, Park Y, Moon H, Kim H, Choi JH, Choi Y, Shim S, Lyu IS, Yun BH, Han Y, Lee D, Lee SY, Yoo BH, Lee KH, Kim TL, Kim H, Shim JS, Nam W, So H, Choi S, Lee S, Shin JI. Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review. *Autoimmun Rev* 2017; 16: 1160-73.
- Lefort CT, Rossaint J, Moser M, Petrich BG, Zarbock A, Monkley SJ, Critchley DR, Ginsberg MH, Fassler R, Ley K. Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation. *Blood* 2012; 119: 4275-82.
- Lefort CT, Ley K. Neutrophil arrest by LFA-1 activation. *Front Immunol* 2012; 3: 157.
- Lescar J, Loris R, Mitchell E, Gautier C, Chazalet V, Cox V, Wyns L, Pérez S, Breton C, Imberty A. Isolectins I-A and I-B of *Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia* - Crystal structure of metal-free GS I-B and molecular basis for metal binding and monosaccharide specificity. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 6608-14.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 678-89.
- Li R, Dong X, Chen S, Tan J, Chen X, Liu J, Wen T, Ru X. Tn antigen promotes breast cancer metastasis via impairment of CASC4. *Cell Biol Int* 2023; 47: 1854-67.
- Li X, Geng X, Fan J, Yan F, Wang R, Yang Z, Li Y, Wang J, Luo Y, Zhao H. Molecular Mediators of Neutrophil Primary Granule Release Following Acute Ischemic Stroke and their Associated Epigenetic Modulation by HDAC2. *Mol Neurobiol* 2025a; 62: 6544-61.
- Li Z, Li Z, Hu Y, Xie Y, Shi Y, Chen G, Huang J, Xiao Z, Zhu W, Huang H, Wang M, Chen J, Chen X, Liang D. Neutrophil extracellular traps potentiate effector T cells via endothelial senescence in uveitis. *JCI Insight* 2025b; 10
- Li Z, LoBue A, Heuser SK, Li J, Engelhardt E, Papapetropoulos A, Patel HH, Lilley E, Ferdinandy P, Schulz R, Cortese-Krott MM. Best practices for blood collection and anaesthesia in mice: Selection, application and reporting. *Br J Pharmacol* 2025c; 182: 2337-53.
- Liu FT, Stowell SR. The role of galectins in immunity and infection. *Nat Rev Immunol* 2023; 23: 479-94.
- Liu Y, Zhao C, Meng J, Li N, Xu Z, Liu X, Hou S. Galectin-3 regulates microglial activation and promotes inflammation through TLR4/MyD88/NF- κ B in experimental autoimmune uveitis. *Clin Immunol* 2022; 236: 108939.
- Loke I, Ostergaard O, Heegaard NHH, Packer NH, Thaysen-Andersen M. Paucimannose-Rich N-glycosylation of Spatiotemporally Regulated Human Neutrophil Elastase Modulates Its Immune Functions. *Mol Cell Proteomics* 2017; 16: 1507-27.
- Lorenz L, Amann B, Hirmer S, Degroote RL, Hauck SM, Deeg CA. NEU1 is more abundant in uveitic retina with concomitant desialylation of retinal cells. *Glycobiology* 2021; 31: 873-83.
- Macauley MS, Crocker PR, Paulson JC. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 653-66.
- MacDonald E, Forrester A, Valades-Cruz CA, Madsen TD, Hetmanski JHR, Dransart E, Ng Y, Godbole R, Shp AA, Leconte L, Chambon V, Ghosh D, Pinet A, Bhatia D, Lombard B, Loew D, Larsen MR, Leffler H, Lefeber DJ, Clausen H, Blangy A, Caswell P, Shafaq-Zadah M, Mayor S, Weigert R, Wunder C, Johannes L. Growth factor-triggered de-sialylation controls glycolipid-lectin-driven endocytosis. *Nat Cell Biol* 2025; 27: 449-63.
- Malalana F, Stylianides A, McGowan C. Equine recurrent uveitis: Human and equine perspectives. *Vet J* 2015; 206: 22-9.
- Malalana F, Ireland JL, Pinchbeck G, McGowan CM. Equine uveitis in the UK: a retrospective study (2008-2018). *Vet Rec* 2020; 186: 92.
- Malalana F, Ireland JL, Pinchbeck GL, McGowan CM. Risk factors for a first episode of primary uveitis in the UK and proportion of cases that experience recurrence following this first episode. *Equine Vet J* 2023; 55: 42-7.
- Malikides N, Hodgson JL, Rose RJ, Hodgson DR. Cardiovascular, haematological and biochemical responses after large volume blood collection in horses. *Vet J* 2001; 162: 44-55.

- Manning JC, Romero A, Habermann FA, Garcia Caballero G, Kaltner H, Gabius HJ. Lectins: a primer for histochemists and cell biologists. *Histochem Cell Biol* 2017; 147: 199-222.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 519-31.
- Marlin SD, Springer TA. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 1987; 51: 813-9.
- Marsella R, White S, Fadok VA, Wilson D, Mueller R, Outerbridge C, Rosenkrantz W. Equine allergic skin diseases: Clinical consensus guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. *Vet Dermatol* 2023; 34: 175-208.
- Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity* 2003; 19: 583-93.
- Massena S, Christoffersson G, Hjertstrom E, Zcharia E, Vlodavsky I, Ausmees N, Rolny C, Li JP, Phillipson M. A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils. *Blood* 2010; 116: 1924-31.
- Mathias JR, Perrin BJ, Liu TX, Kanki J, Look AT, Huttenlocher A. Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 1281-8.
- Mawhinney M, Kulle A, Thanabalasuriar A. From infection to repair: Understanding the workings of our innate immune cells. *WIREs Mech Dis* 2022; 14: e1567.
- McDonald HR, Schatz H, Allen AW, Chenoweth RG, Cohen HB, Crawford JB, Klein R, May DR, Snider JD, 3rd. Retinal toxicity secondary to intraocular gentamicin injection. *Ophthalmology* 1986; 93: 871-7.
- McMullen RJ, Jr., Fischer BM. Medical and Surgical Management of Equine Recurrent Uveitis. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2017; 33: 465-81.
- Medzihradzsky KF, Kaasik K, Chalkley RJ. Tissue-Specific Glycosylation at the Glycopeptide Level. *Mol Cell Proteomics* 2015; 14: 2103-10.
- Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 2004; 172: 2731-8.
- Mochizuki M, Kuwabara T, McAllister C, Nussenblatt RB, Gery I. Adoptive transfer of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. Immunopathogenic mechanisms and histologic features. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26: 1-9.
- Monsigny M, Sene C, Obrenovitch A, Roche AC, Delmotte F, Boschetti E. Properties of succinylated wheat-germ agglutinin. *Eur J Biochem* 1979; 98: 39-45.
- Morel M, Pochard P, Echchi W, Dueymes M, Bagacean C, Jousse-Joulin S, Devauchelle-Pensec V, Cornec D, Jamin C, Pers JO, Bordron A. Abnormal B cell glycosylation in autoimmunity: A new potential treatment strategy. *Front Immunol* 2022; 13: 975963.
- Moren S, Kallberg M, Strom L. Equine uveitis: Outcome and adverse effects after one or two intravitreal low-dose gentamicin injections. *Equine Vet J* 2024;
- Moren S, Kallberg M, Strom L. Equine uveitis: Outcome and adverse effects after one or two intravitreal low-dose gentamicin injections. *Equine Vet J* 2025; 57: 160-8.
- Ng LG, Ostuni R, Hidalgo A. Heterogeneity of neutrophils. *Nat Rev Immunol* 2019; 19: 255-65.
- Nicholson T, Macleod M, Belli A, Lord JM, Hazeldine J. Major Traumatic Injury and Exposure to Mitochondrial-Derived Damage-Associated Molecular Patterns Promotes Neutrophil Survival Accompanied by Stabilisation of the Anti-Apoptotic Protein Mcl-1. *Cells* 2025; 14
- Ninagawa S, Matsuo M, Ying D, Oshita S, Aso S, Matsushita K, Taniguchi M, Fueki A, Yamashiro M, Sugawara K, Saito S, Imami K, Kizuka Y, Sakuma T, Yamamoto T, Yagi H, Kato K, Mori K. UGGT1-mediated reglucosylation of N-glycan competes with ER-associated degradation of unstable and misfolded glycoproteins. *Elife* 2024; 12
- Noordwijk KJ, Qin R, Diaz-Rubio ME, Zhang S, Su J, Mahal LK, Reesink HL. Metabolism and global protein glycosylation are differentially expressed in healthy and osteoarthritic equine carpal synovial fluid. *Equine Vet J* 2022; 54: 323-33.

- Novak J, King RG, Yother J, Renfrow MB, Green TJ. O-glycosylation of IgA1 and the pathogenesis of an autoimmune disease IgA nephropathy. *Glycobiology* 2024; 34
- Ogulur I, Mitamura Y, Yazici D, Pat Y, Ardicli S, Li M, D'Avino P, Beha C, Babayev H, Zhao B, Zeyneloglu C, Giannelli Viscardi O, Ardicli O, Kiykim A, Garcia-Sanchez A, Lopez JF, Shi LL, Yang M, Schneider SR, Skolnick S, Dhir R, Radzikowska U, Kulkarni AJ, Imam MB, Veen WV, Sokolowska M, Martin-Fontecha M, Palomares O, Nadeau KC, Akdis M, Akdis CA. Type 2 immunity in allergic diseases. *Cell Mol Immunol* 2025; 22: 211-42.
- Ohnishi T, Muroi M, Tanamoto K. MD-2 is necessary for the toll-like receptor 4 protein to undergo glycosylation essential for its translocation to the cell surface. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10: 405-10.
- Orlean P, Menon AK. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycopospholipids. *J Lipid Res* 2007; 48: 993-1011.
- Ostendorf L, Garantziotis P, Huang FY, Schett G, Accelerating Medicines Partnership RASLEN, Lederer JA, Fava A, Rao DA, Grieshaber-Bouyer R. Neutrophil Heterogeneity Identifies an Association of LAMP1 With Proliferative Lupus Nephritis. *Eur J Immunol* 2025; 55: e70022.
- Padjasek M, Qasem B, Cisko-Pakuluk A, Marycz K. Cyclosporine A Delivery Platform for Veterinary Ophthalmology-A New Concept for Advanced Ophthalmology. *Biomolecules* 2022; 12
- Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* 2018; 18: 134-47.
- Patel RS, Tomlinson JE, Divers TJ, Van de Walle GR, Rosenberg BR. Single-cell resolution landscape of equine peripheral blood mononuclear cells reveals diverse cell types including T-bet(+) B cells. *BMC Biol* 2021; 19: 13.
- Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 2444-8.
- Pell J, Menon MC. GALNT14 deficiency: connecting multiple links in the IgA nephropathy pathogenetic chain. *Journal of Clinical Investigation* 2025; 135
- Peng X, Li Y, Sun X, Ren G, Li H, Wang X, Wang PG, Wang Q, Ji Y. Therapeutic effect of galactosyltransferase- and sialyltransferase-encoding mRNA in rheumatoid arthritis. *Mol Ther* 2025; 33: 4143-55.
- Perez-Riverol Y, Csordas A, Bai J, Bernal-Llinares M, Hewapathirana S, Kundu DJ, Inuganti A, Griss J, Mayer G, Eisenacher M, Perez E, Uszkoreit J, Pfeuffer J, Sachsenberg T, Yilmaz S, Tiwary S, Cox J, Audain E, Walzer M, Jarnuczak AF, Ternent T, Brazma A, Vizcaino JA. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res* 2019; 47: D442-D50.
- Petri B, Phillipson M, Kubes P. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *J Immunol* 2008; 180: 6439-46.
- Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med* 2006; 203: 2569-75.
- Phillipson M, Kaur J, Colarusso P, Ballantyne CM, Kubes P. Endothelial domes encapsulate adherent neutrophils and minimize increases in vascular permeability in paracellular and transcellular emigration. *PLoS One* 2008; 3: e1649.
- Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med* 2011; 17: 1381-90.
- Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, Tesselaar K, Koenderman L. In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 2010; 116: 625-7.
- Pilsczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, Robbins SM, Green FH, Surette MG, Sugai M, Bowden MG, Hussain M, Zhang K, Kubes P. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 2010; 185: 7413-25.

- Pinho SS, Alves I, Gaifem J, Rabinovich GA. Immune regulatory networks coordinated by glycans and glycan-binding proteins in autoimmunity and infection. *Cell Mol Immunol* 2023; 20: 1101-13.
- Pisetsky DS. Pathogenesis of autoimmune disease. *Nat Rev Nephrol* 2023; 19: 509-24.
- Plummer CE, Polk T, Sharma J, Bae SS, Barr O, Jones A, Kitchen H, Wilhelmy M, Devin K, Clay Smith W, Kolaczowski BD, Larkin J, 3rd. Open label safety and efficacy pilot to study mitigation of equine recurrent uveitis through topical suppressor of cytokine signaling-1 mimetic peptide. *Sci Rep* 2022; 12: 7177.
- Podolsky MJ, Lasker A, Flaminio MJ, Gowda LD, Ezekowitz RA, Takahashi K. Characterization of an equine mannose-binding lectin and its roles in disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343: 928-36.
- Prakash S, Steers NJ, Li YF, Sanchez-Rodriguez E, Verbitsky M, Robbins I, Simpson J, Pathak S, Raska M, Reily C, Ng A, Liang J, DeMaria N, Katiraei A, Stevens KO, Fischman C, Shapiro S, Kodali S, McCutchan J, Park H, Eliby D, Delsante M, Allegri L, Fiaccadori E, Bodria M, Marasa M, Raveche E, Julian BA, Uhlemann AC, Kiryluk K, Zhang H, D'Agati VD, Sanna-Cherchi S, Novak J, Gharavi AG. Loss of GalNAc-T14 links-glycosylation defects to alterations in B cell homing in IgA nephropathy. *Journal of Clinical Investigation* 2025; 135
- Quinn J, Salman A, Paluch C, Jackson-Wood M, McClements ME, Luo J, Davis SJ, Cornall RJ, MacLaren RE, Dendrou CA, Xue K. Single-cell transcriptomic analysis of retinal immune regulation and blood-retinal barrier function during experimental autoimmune uveitis. *Sci Rep* 2024; 14: 20033.
- Rabinovich GA, Toscano MA. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 338-52.
- Radovani B, Gudelj I. N-Glycosylation and Inflammation; the Not-So-Sweet Relation. *Front Immunol* 2022; 13: 893365.
- Raza F, Babasyan S, Larson EM, Freer HS, Schnabel CL, Wagner B. Peripheral blood basophils are the main source for early interleukin-4 secretion upon in vitro stimulation with *Culicoides* allergen in allergic horses. *PLoS One* 2021; 16: e0252243.
- Reesink HL, Sutton RM, Shurer CR, Peterson RP, Tan JS, Su J, Paszek MJ, Nixon AJ. Galectin-1 and galectin-3 expression in equine mesenchymal stromal cells (MSCs), synovial fibroblasts and chondrocytes, and the effect of inflammation on MSC motility. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8: 243.
- Remacha AR, Barrachina L, Alvarez-Arguedas S, Ranera B, Romero A, Vazquez FJ, Zaragoza P, Yanez R, Martin-Burriel I, Rodellar C. Expression of genes involved in immune response and in vitro immunosuppressive effect of equine MSCs. *Vet Immunol Immunopathol* 2015; 165: 107-18.
- Rosales C. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol* 2020; 108: 377-96.
- Rungelrath V, Kobayashi SD, DeLeo FR. Neutrophils in innate immunity and systems biology-level approaches. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2020; 12: e1458.
- Sampson JF, Hasegawa E, Mulki L, Suryawanshi A, Jiang S, Chen WS, Rabinovich GA, Connor KM, Panjwani N. Galectin-8 Ameliorates Murine Autoimmune Ocular Pathology and Promotes a Regulatory T Cell Response. *PLoS One* 2015; 10: e0130772.
- Scapini P, Marini O, Tecchio C, Cassatella MA. Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunol Rev* 2016; 273: 48-60.
- Schjoldager KT, Narimatsu Y, Joshi HJ, Clausen H. Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; 21: 729-49.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012; 9: 671-5.
- Shao B, Yago T, Setiadi H, Wang Y, Mehta-D'souza P, Fu J, Crocker PR, Rodgers W, Xia L, McEver RP. O-glycans direct selectin ligands to lipid rafts on leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112: 8661-6.

- Signoretto I, Calzetti F, Finotti G, Lonardi S, Balanzin C, Bianchetto-Aguilera F, Gasperini S, Gardiman E, Castellucci M, Russignan A, Bonifacio M, Sica A, Vermi W, Tecchio C, Scapini P, Tamassia N, Cassatella MA. Uncovering two neutrophil-committed progenitors that immediately precede promyelocytes during human neutropoiesis. *Cell Mol Immunol* 2025; 22: 316-29.
- Silvestre-Roig C, Fridlender ZG, Glogauer M, Scapini P. Neutrophil Diversity in Health and Disease. *Trends Immunol* 2019; 40: 565-83.
- Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 31-9.
- Singh SS, Devi SK, Ng TB. Banana lectin: a brief review. *Molecules* 2014; 19: 18817-27.
- Sonoda KH, Yoshimura T, Egashira K, Charo IF, Ishibashi T. Neutrophil-dominant experimental autoimmune uveitis in CC-chemokine receptor 2 knockout mice. *Acta Ophthalmol* 2011; 89: e180-8.
- Soth R, Hoffmann ALC, Deeg CA. Enhanced ROS Production and Mitochondrial Metabolic Shifts in CD4(+) T Cells of an Autoimmune Uveitis Model. *Int J Mol Sci* 2024; 25
- Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988; 241: 58-62.
- Spieß BM. Equine recurrent uveitis: the European viewpoint. *Equine Vet J Suppl* 2010: 50-6.
- Stafford LS, Plummer CE, Smith WC, Gibson DJ, Sharma J, Vicuna V, Diakite S, Larkin J, 3rd. A peptide mimic of SOCS1 modulates equine peripheral immune cells in vitro and ocular effector functions in vivo: implications for recurrent uveitis. *Front Immunol* 2024; 15: 1513157.
- Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 2005; 22: 285-94.
- Steenfot C, Vakhrushev SY, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT, Kong Y, Bennett EP, Mandel U, Wandall H, Lavery SB, Clausen H. Mining the O-glycoproteome using zinc-finger nuclease-glycoengineered SimpleCell lines. *Nat Methods* 2011; 8: 977-82.
- Steenfot C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT, Lavrsen K, Dabelsteen S, Pedersen NB, Marcos-Silva L, Gupta R, Bennett EP, Mandel U, Brunak S, Wandall HH, Lavery SB, Clausen H. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J* 2013; 32: 1478-88.
- Strydom N, Rankin SM. Regulation of circulating neutrophil numbers under homeostasis and in disease. *J Innate Immun* 2013; 5: 304-14.
- Su B, Zhang Q, Hu X, Xie B, Chen C, Zhao Y, Liu Z, Ma L, Chen J. Role of basophils and type 2 inflammation in bullous pemphigoid pathophysiology: a comparative study of blood and blister fluid. *Immunol Res* 2025; 73: 68.
- Su Z, Xie Q, Wang Y, Li Y. Abberant Immunoglobulin G Glycosylation in Rheumatoid Arthritis by LTQ-ESI-MS. *Int J Mol Sci* 2020; 21
- Sun Y, Li X, Wang T, Li W. Core Fucosylation Regulates the Function of Pre-BCR, BCR and IgG in Humoral Immunity. *Front Immunol* 2022; 13: 844427.
- Suurmond J, Stoop JN, Rivellese F, Bakker AM, Huizinga TW, Toes RE. Activation of human basophils by combined toll-like receptor- and FcepsilonRI-triggering can promote Th2 skewing of naive T helper cells. *Eur J Immunol* 2014; 44: 386-96.
- Swadzba ME, Hirmer S, Amann B, Hauck SM, Deeg CA. Vitreal IgM autoantibodies target neurofilament medium in a spontaneous model of autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53: 294-300.
- Swanson MD, Boudreaux DM, Salmon L, Chugh J, Winter HC, Meagher JL, Andre S, Murphy PV, Oscarson S, Roy R, King S, Kaplan MH, Goldstein IJ, Tarbet EB, Hurst BL, Smee DF, de la Fuente C, Hoffmann HH, Xue Y, Rice CM, Schols D, Garcia JV, Stuckey JA, Gabius HJ, Al-Hashimi HM, Markovitz DM. Engineering a therapeutic lectin by uncoupling mitogenicity from antiviral activity. *Cell* 2015; 163: 746-58.
- Szabo E, Farago A, Bodor G, Gemes N, Puskas LG, Kovacs L, Szebeni GJ. Identification of immune subsets with distinct lectin binding signatures using multi-parameter flow cytometry: correlations with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Front Immunol* 2024; 15: 1380481.

- Tak T, Tesselaar K, Pillay J, Borghans JA, Koenderman L. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J Leukoc Biol* 2013; 94: 595-601.
- Tan ACR, Ma Y, Appukuttan B, Lower K, Lumsden AL, Michael MZ, Smith JR, Ashander LM. Brief research report: ETS-1 blockade increases ICAM-1 expression in activated human retinal endothelial cells. *Front Ophthalmol (Lausanne)* 2024; 4: 1384428.
- Tian M, Li X, Yu L, Qian J, Bai X, Yang J, Deng R, Lu C, Zhao H, Liu Y. Glycosylation as an intricate post-translational modification process takes part in glycoproteins related immunity. *Cell Commun Signal* 2025; 23: 214.
- Togashi T, Ishihara R, Watanabe R, Shiomi M, Yano Y, Fujisawa Y, Katsushima M, Fukumoto K, Yamada S, Hashimoto M. Rheumatoid Factor: Diagnostic and Prognostic Performance and Therapeutic Implications in Rheumatoid Arthritis. *J Clin Med* 2025; 14
- Tomlinson KL, Riquelme SA, Baskota SU, Drić M, Monk IR, Stinear TP, Lewis IA, Prince AS. *Staphylococcus aureus* stimulates neutrophil itaconate production that suppresses the oxidative burst. *Cell Rep* 2023; 42: 112064.
- Uchio E, Kijima M, Tanaka S, Ohno S. Suppression of experimental uveitis with monoclonal antibodies to ICAM-1 and LFA-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 2626-31.
- Ueki S, Konno Y, Takeda M, Moritoki Y, Hirokawa M, Matsuwaki Y, Honda K, Ohta N, Yamamoto S, Takagi Y, Wada A, Weller PF. Eosinophil extracellular trap cell death-derived DNA traps: Their presence in secretions and functional attributes. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 137: 258-67.
- Ueno H, Kitano E, Mori S, Takahashi Y, Murakami S, Wani K, Matsumoto Y, Okamoto M, Ishihara T. Layer- and region-specific distribution of chondroitinase-resistant, lectin-binding extracellular matrix structures in the mouse somatosensory cortex and hippocampus. *Neuroscience* 2025;
- Ugonotti J, Chatterjee S, Thaysen-Andersen M. Structural and functional diversity of neutrophil glycosylation in innate immunity and related disorders. *Mol Aspects Med* 2021; 79: 100882.
- Uhl PB, Szober CM, Amann B, Alge-Priglinger C, Ueffing M, Hauck SM, Deeg CA. In situ cell surface proteomics reveals differentially expressed membrane proteins in retinal pigment epithelial cells during autoimmune uveitis. *J Proteomics* 2014; 109: 50-62.
- Uhl PB, Amann B, Hauck SM, Deeg CA. Novel localization of peripherin 2, the photoreceptor-specific retinal degeneration slow protein, in retinal pigment epithelium. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 2678-92.
- Van Antwerpen P, Slomianny MC, Boudjeltia KZ, Delporte C, Faid V, Calay D, Rousseau A, Moguilevsky N, Raes M, Vanhamme L, Furtmuller PG, Obinger C, Vanhaeverbeek M, Neve J, Michalski JC. Glycosylation pattern of mature dimeric leukocyte and recombinant monomeric myeloperoxidase: glycosylation is required for optimal enzymatic activity. *J Biol Chem* 2010; 285: 16351-9.
- van Kessel KP, Bestebroer J, van Strijp JA. Neutrophil-Mediated Phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Front Immunol* 2014; 5: 467.
- van Kooyk Y, Rabinovich GA. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nature Immunology* 2008; 9: 593-601.
- van Vliet SJ, Saeland E, van Kooyk Y. Sweet preferences of MGL: carbohydrate specificity and function. *Trends Immunol* 2008; 29: 83-90.
- Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology* 2017; 27: 3-49.
- Venkatakrishnan V, Dieckmann R, Loke I, Tjondro HC, Chatterjee S, Bylund J, Thaysen-Andersen M, Karlsson NG, Karlsson-Bengtsson A. Glycan analysis of human neutrophil granules implicates a maturation-dependent glycosylation machinery. *J Biol Chem* 2020; 295: 12648-60.
- Vono M, Lin A, Norrby-Teglund A, Koup RA, Liang F, Lore K. Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4(+) T cells in vitro and ex vivo. *Blood* 2017; 129: 1991-2001.
- Wang H, Kim SJ, Lei Y, Wang S, Wang H, Huang H, Zhang H, Tsung A. Neutrophil extracellular traps in homeostasis and disease. *Signal Transduct Target Ther* 2024a; 9: 235.
- Wang J, Hossain M, Thanabalasuriar A, Gunzer M, Meininger C, Kubes P. Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair. *Science* 2017; 358: 111-6.

LITERATURVERZEICHNIS

- Wang J, Zhang HM, Zhu GH, Zhao LL, Shi J, Dai ZT, Li JP, Li XR, Sun F, Wu Y, Chen SY, Li HN, Liao XH, Xiang Y. STT3-mediated aberrant N-glycosylation of CD24 inhibits paclitaxel sensitivity in triple-negative breast cancer. *Acta Pharmacol Sin* 2025; 46: 1097-110.
- Wang R, Lan C, Benlagha K, Camara NOS, Miller H, Kubo M, Heegaard S, Lee P, Yang L, Forsman H, Li X, Zhai Z, Liu C. The interaction of innate immune and adaptive immune system. *MedComm* (2020) 2024b; 5: e714.
- Weigand M, Hauck SM, Deeg CA, Degroote RL. Deviant proteome profile of equine granulocytes associates to latent activation status in organ specific autoimmune disease. *J Proteomics* 2021; 230: 103989.
- Wen L, Moser M, Ley K. Molecular mechanisms of leukocyte beta2 integrin activation. *Blood* 2022a; 139: 3480-92.
- Wen L, Lyu Q, Ley K, Goult BT. Structural Basis of beta2 Integrin Inside-Out Activation. *Cells* 2022b; 11
- Wengner AM, Pitchford SC, Furze RC, Rankin SM. The coordinated action of G-CSF and ELR plus CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute inflammation. *Blood* 2008; 111: 42-9.
- Werry H, Gerhards H. [The surgical therapy of equine recurrent uveitis]. *Tierarztl Prax* 1992; 20: 178-86.
- Whitcup SM, DeBarge LR, Caspi RR, Harning R, Nussenblatt RB, Chan CC. Monoclonal antibodies against ICAM-1 (CD54) and LFA-1 (CD11a/CD18) inhibit experimental autoimmune uveitis. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 67: 143-50.
- Wiedemann C, Amann B, Degroote RL, Witte T, Deeg CA. Aberrant Migratory Behavior of Immune Cells in Recurrent Autoimmune Uveitis in Horses. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 101.
- Wigerblad G, Cao Q, Brooks S, Naz F, Gadkari M, Jiang K, Gupta S, O'Neil L, Dell'Orso S, Kaplan MJ, Franco LM. Single-Cell Analysis Reveals the Range of Transcriptional States of Circulating Human Neutrophils. *J Immunol* 2022; 209: 772-82.
- Wigerblad G, Kaplan MJ. Neutrophil extracellular traps in systemic autoimmune and autoinflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 2023; 23: 274-88.
- Wolfert MA, Boons GJ. Adaptive immune activation: glycosylation does matter. *Nature Chemical Biology* 2013; 9: 776-84.
- Wollanke B, Gerhards H, Ackermann K. Infectious Uveitis in Horses and New Insights in Its Leptospiral Biofilm-Related Pathogenesis. *Microorganisms* 2022; 10
- Wu Y, Cao Z, Liu W, Cahoon JG, Wang K, Wang P, Hu L, Chen Y, Moser M, Vella AT, Ley K, Wen L, Fan Z. Nanoscopy reveals integrin clustering reliant on kindlin-3 but not talin-1. *Cell Commun Signal* 2025a; 23: 12.
- Wu Y, Zhang W, Liao Y, Sun T, Liu Y, Liu Y. Immune cell aberrations in Systemic Lupus Erythematosus: navigating the targeted therapies toward precision management. *Cell Mol Biol Lett* 2025b; 30: 73.
- Wuhrer M. Paucity of Paucimannosylation Revoked. *Proteomics* 2019; 19: e1900244.
- Xue J, Nian M, Liang Y, Zhu Z, Hu Z, Jia Y, Chi S, Chen J. Neutrophil extracellular traps (NETs) are increased in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Respir Res* 2025; 26: 33.
- Yago T, Fu J, McDaniel JM, Miner JJ, McEver RP, Xia L. Core 1-derived O-glycans are essential E-selectin ligands on neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 9204-9.
- Yang JM, Yun K, Jeon J, Yang HY, Kim B, Jeong S, Lee J, Oh WY, Uemura A, Song JS, Kim P, Lee JY. Multimodal evaluation of an interphotoreceptor retinoid-binding protein-induced mouse model of experimental autoimmune uveitis. *Exp Mol Med* 2022; 54: 252-62.
- Zhang F, Xia Y, Su J, Quan F, Zhou H, Li Q, Feng Q, Lin C, Wang D, Jiang Z. Neutrophil diversity and function in health and disease. *Signal Transduct Target Ther* 2024; 9: 343.
- Zhang L, Borjini N, Lun Y, Parab S, Asonye G, Singh R, Bell BA, Bonilha VL, Ivanov A, Fox DA, Caspi RR, Lin F. CDCP1 regulates retinal pigmented epithelial barrier integrity for the development of experimental autoimmune uveitis. *JCI Insight* 2022; 7

LITERATURVERZEICHNIS

- Zhang S, Wen Q, Su S, Wang Y, Wang J, Xie N, Zhu W, Wen X, Di L, Lu Y, Xu M, Wang M, Chen H, Duo J, Huang Y, Wan D, Tao Z, Zhao S, Chai G, Hao J, Da Y. Peripheral immune profiling highlights a dynamic role of low-density granulocytes in myasthenia gravis. *J Autoimmun* 2025; 152: 103395.
- Zhang X, Wang Y. Glycosylation Quality Control by the Golgi Structure. *J Mol Biol* 2016; 428: 3183-93.
- Zhang YW, Davis EG, Blecha F, Wilkerson MJ. Molecular cloning and characterization of equine Toll-like receptor 9. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 124: 209-19.
- Zheng M, Zhang L, Yu H, Hu J, Cao Q, Huang G, Huang Y, Yuan G, Kijlstra A, Yang P. Genetic polymorphisms of cell adhesion molecules in Behcet's disease in a Chinese Han population. *Sci Rep* 2016; 6: 24974.
- Zhou B, Tsaknakis G, Coldwell KE, Khoo CP, Roubelakis MG, Chang CH, Pepperell E, Watt SM. A novel function for the haemopoietic supportive murine bone marrow MS-5 mesenchymal stromal cell line in promoting human vasculogenesis and angiogenesis. *Br J Haematol* 2012; 157: 299-311.
- Zschaler J, Schlorke D, Arnhold J. Differences in innate immune response between man and mouse. *Crit Rev Immunol* 2014; 34: 433-54.

9 DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich mich bei meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Cornelia A. Deeg, bedanken, die mich immer wieder darauf hingewiesen hat, wie attraktiv Neutrophile sind und mich so für diese unglaublich interessanten Immunzellen begeistern konnte. Darüber hinaus möchte ich mich auch herzlich für die Unterstützung bei der Anfertigung aller Teile dieser Arbeit bedanken, sowie für die stets schnellen Rückmeldungen und hilfreichen Korrekturen.

Außerdem bedanke ich mich bei der Pferdeklunik der LMU München für die konstante Bereitstellung von Probenmaterial von an ERU erkrankten Pferden für meine Arbeit und die Möglichkeit, Blutproben von den Klinikpferden zu gewinnen. Anbei noch ein besonderer Dank an das Sekretariat, das stets freundlich und zuverlässig mit uns kommunizierte.

Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Roxane Degroote, Dr. Adrian Schmalen, Dr. Kristina Kleinwort und Dr. Ulrich Wilk, die mir stets mit Rat und Tat in wissenschaftlichen und manchmal auch nicht-wissenschaftlichen Belangen zur Seite gestanden haben. Vor allem Dr. Roxane Degroote, die sich stets für mich und meine Arbeit Zeit genommen hat und mir auch manchmal als Sorgenfresser zur Seite stand, etwas, was ich ganz besonders zu schätzen weiß und sicher nicht selbstverständlich ist.

Danke auch meinen Kollegen Dr. Anne Hoffmann, Dr. Felix Gard, Dr. Heidi Duda, Dr. Amelie Fleischer, Dr. Ronja Söth, Lili Flad, Sabrina Albinger, Ismini Christofi, Barbara Riedel, Jana Schreff, Jasmin Wassmann, Lia, Antczak und Salome Fischer. Erst ihr habt die Zeit in der AG Deeg zu etwas ganz Besonderem gemacht, weshalb ich immer gern ins Institut gekommen bin. Ihr habt mich nicht nur auf fachlicher, sondern auch auf menschlicher Ebene unterstützt und seid mir einfach in den letzten zweieinhalb Jahren sehr ans Herz gewachsen. Ich werde die Zeit mit euch innerhalb und außerhalb des Instituts sehr vermissen. Insbesondere Lili Flad, die mit mir zusammen nicht nur das Büro, sondern auch all das Leid während der Schreibzeit und diverser anderer Lebenskrisen geteilt hat. Ich hätte mir keine bessere Kollegin und inzwischen gute Freundin für diese anstrengende Zeit wünschen können, denn ohne das Hotel Calilo wäre es sicher nur halb so erträglich gewesen.

DANKSAGUNG

Ein großes Dankeschön gilt auch unseren exzellenten technischen Assistenten Tanja Weißer, Stefanie Püls, Miriam Telorac, Jonas Liedl, Lydia Hoffmann, Ursula Cramer und Barbara Amann für ihre großartige Arbeit im Labor und ihre stets tatkräftige Unterstützung. Besonders Barbara Amann, für die vielen Stunden am PC, die sie für mich geopfert hat. Dafür bin ich sehr dankbar. Außerdem möchte ich auch Tanjas Staubsauger Maila für ihren Beistand danken.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich auch während meiner Doktorarbeit tatkräftig unterstützt und an mich geglaubt hat. Danke für die Bereitstellung des gut ausgestatten Büros meines Bruders, die stets aufmunternden Worten meines Vaters, die kontinuierliche Kaffee- und Keksversorgung durch meine Schwägerin und die stets fröhlichen Art meiner Nichte, die mir immer lächelnd durch das Bürofenster zugewunken hat, wenn ich mal wieder etwas verzweifelt vor dem PC saß. Meine andere Nichte soll hier auch nicht unerwähnt bleiben. Zwar war sie während der Erstellung dieser Arbeit noch nicht geboren, aber dachte sich wohl, dass der Tag meiner Promotion ein hervorragender Geburtstag wäre und machte damit diesen Tag noch besser. Und daher wird sie sich diese Anekdote ein Leben lang anhören müssen. Auch meiner Tante möchte ich an dieser Stelle noch danken, die diese Arbeit in Windeseile grammatikalisch korrigiert hat.

Und schließlich meiner Mutter, die mir beigebracht hat, dass ich alles schaffen kann, was ich mir in meinen „Grind“ setze.